

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAIS LATANSIO DE OLIVEIRA

AValiação dos efeitos biológicos das frações do látex de *Euphorbia umbellata* PAX BRUYNS e do triterpeno EUFOL: NO SISTEMA COMPLEMENTO, QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS E TOXICIDADE CELULAR

CURITIBA

2019

THAIS LATANSIO DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DAS FRAÇÕES DO LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* PAX BRUYNS E DO TRITERPENO EUFOL: NO SISTEMA COMPLEMENTO, QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS E TOXICIDADE CELULAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profª. Dra. Iara José de Messias-Reason
Coorientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame

CURITIBA

2019

Oliveira, Thais Latansio de

Avaliação dos efeitos biológicos das frações do látex de *Euphorbia umbellata* Pax Bruynse do triterpeno eufol [recurso eletrônico]: no sistema complemento, quimiotaxia de neutrófilos e toxicidade celular / Thais Latansio de Oliveira – Curitiba, 2019.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Professora Dra. Iara José de Taborda Messias-Reason
Coorientador: Professor Dr. Flávio Luís Beltrame

1. *Euphorbia umbellata*. 2. Eufol. 3. Quimiotaxia. I. Messias-Reason, Iara José de Taborda. II. Beltrame, Flávio Luís. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.95



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **THAIS LATANSIO DE OLIVEIRA** intitulada: "**Avaliação dos efeitos biológicos das frações do látex de *Euphorbia umbellata* PAX BRUYNS e do triterpeno Eufol: no sistema complemento, quimiotaxia de neutrófilos e toxicidade celular**", sob orientação da Profa. Dra. IARA JOSE DE MESSIAS REASON, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 13 de Dezembro de 2019.

IARA JOSE DE MESSIAS REASON
Presidente da Banca Examinadora

LORENA BAVIA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

DANIELA GASPARD FOLQUITTO
Avaliador Externo (null)

JULIANE NADAL DIAS SWIECH
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

FERNANDA BOVO
Avaliador Externo (SECRETARIA DE ESTADO DA EDUCAÇÃO DO PARANÁ)

*Dedico este trabalho aos meus amados pais,
José Luiz e Maria Angela,
por serem a base para todo o meu desenvolvimento.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente em minha vida e guiar meus passos. Por me cercar de oportunidades e pessoas maravilhosas, e por tantas bênçãos derramadas em minha vida;

Aos meus pais, por serem responsáveis por tudo que sou, pelo incentivo, pelo amor incondicional, por me darem força e estarem sempre presentes em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, André e Natalia, por sempre me incentivarem e apoiarem.

Ao meu namorado, Luiz Gustavo, pelo companheirismo, carinho, paciência, por acreditar nas minhas escolhas e me apoiar durante todo o caminho.

À minha orientadora Prof.^a Iara Messias-Reason por sua sabedoria, dedicação e paciência em todos os momentos, por me receber em seu laboratório sem me conhecer, me dar a oportunidade de realizar esse trabalho e me permitir crescer como pesquisadora.

Ao Prof. Flávio Luís Beltrame pela coorientação deste trabalho, por dividir seus conhecimentos e sua experiência, pela atenção dispensada, pela dedicação e por todas as sugestões que contribuíram para o meu crescimento e realização desse trabalho.

As queridas amigas de laboratório Lorena Bavia e Pamela Fontana pela participação direta na realização dos ensaios do complemento e por nunca medirem esforços para me ajudar. Espero que nossos futuros ainda se cruzem.

Aos demais companheiros do Laboratorio de imunopatologia molecular pelos momentos agradáveis de convivência.

À Prof^ª Katia Paludo e Prof^ª Carla Kanunfre por toda ajuda com os ensaios celulares e à Prof^ª Amanda Rabelo pela disposição e atenção com os ensaios de quimiotaxia.

Ao pessoal do laboratório de Tecnologia de fitoterápicos, especialmente a doutoranda Luiza Stolz por toda cooperação e disposição em me ajudar.

Às queridas amigas Daniela Gaspardo Folquitto, Juliane Nadal Dias Swiech e Vanessa Barbosa pelas inúmeras viagens a Curitiba, por tornarem esse tempo mais leve e agradável e, à Daniela e Juliane, especialmente, por aceitarem participar desta banca de defesa.

A todos os amigos pelas conversas, conselhos e carinho, especialmente, Adriana Maria Silva, Bruna Goncalves, Clara Goltz, Ludmila Hilgemberg, Sandineli Bini, Rosana dos Santos e Edenilde Bastos, suas companhias sempre foram motivo de alegria e nossos cafés serviam para que minhas energias fossem recarregadas.

À Universidade Federal do Paraná, em especial a coordenação do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, à Universidade Estadual de Ponta Grossa e à CAPES pela infraestrutura e incentivo financeiro.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O sistema complemento desempenha um importante papel na imunidade humoral e inata e pode ser ativado por três vias: clássica (VC), alternativa (VA) e lectina (VL). Essas vias são ativadas por diferentes mecanismos que culminam em uma cascata proteolítica que elimina microrganismos e desencadeia o processo inflamatório. Sua ativação exacerbada está relacionada a reações autoimunes, doenças inflamatórias, promoção de crescimento tumoral e metástase. A espécie *Euphorbia umbellata* Pax Bruyns tem sido tradicionalmente utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias e câncer. Suas atividades biológicas são atribuídas aos constituintes químicos presentes em sua composição como terpenos, alcaloides e flavonoides. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol do látex de *E. umbellata* e do composto majoritário presente nesta matriz, eufol, sobre a ativação das vias do sistema complemento e na quimiotaxia de neutrófilos, bem como, a atividade do eufol em cultura de células HRT18, B16F10 e 3T3 e seus possíveis mecanismos de indução de morte celular. A avaliação do complemento foi realizada utilizando ensaios hemolíticos para VC e VA e ELISA para VL, e, a quimiotaxia de neutrófilos, foi realizada utilizando a caseína como indutor quimiotático e câmara de Boyden. A citotoxicidade foi avaliada pelas metodologias de redução do MTT, internalização do vermelho neutro pelos lisossomos, cálculo do IC₅₀ e índice de seletividade. Os mecanismos de morte celular foram avaliados pela morfologia celular à fresco e com coloração hematológica; e o ciclo celular e potencial transmembrânico de mitocôndria através de citometria de fluxo. Todas as frações do látex de *E. umbellata* e eufol induziram um efeito inibitório na ativação da VA. Na VC as frações metanol e acetato de etila inibiram a ativação, e os extratos clorofórmio e o eufol ativaram esta via. A VL foi inibida pela fração hexano, acetato de etila e eufol. A quimiotaxia de neutrófilos foi inibida por todas as frações do látex e pelo eufol. O eufol também foi capaz de induzir morte celular pelas duas metodologias de citotoxicidade avaliadas, no entanto a técnica de internalização do vermelho neutro foi mais sensível. Os valores de IC₅₀ foram 62,7±7,6, 70,7±4,3, 39,0±6,5 µM para B16F10, HRT18 e 3T3, respectivamente, e o índice de seletividade 0,62 e 0,55 para B16F10 e HRT18. A morfologia das células tratadas com eufol mostraram sinais de morte apoptótica tanto na visualização à fresco quanto com coloração hematológica. Já as análises das fases do ciclo celular e do potencial transmembrânico de mitocôndria não mostraram alterações quando comparadas ao grupo controle. Assim, é possível concluir que o fitocomplexo e o eufol isolado das frações de látex de *E. umbellata* têm potencial para uso no tratamento de doenças inflamatórias relacionadas ao complemento e possível aplicação na terapia do câncer.

Palavras chave: *Euphorbia umbellata*. Eufol. Sistema complemento. Quimiotaxia. Citotoxicidade.

ABSTRACT

The complement system plays an important role in humoral and innate immunity and can be activated by three pathways: classical (CP), alternative (AP) and lectin (LP). These pathways are activated by different mechanisms that culminate in a proteolytic cascade that eliminates microorganisms and triggers the inflammatory process. Its exacerbated activation is related to autoimmune reactions, inflammatory diseases, tumor growth promotion and metastasis. The species *Euphorbia umbellata* Pax Bruyns has been traditionally used for the treatment of inflammatory diseases and cancer. Its biological activities are attributed to the chemical constituents present in its composition as terpenes, alkaloids and flavonoids. The aim of this work was to evaluate the effect of hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol fractions of *E. umbellata* latex and the major compound present in this matrix, euphol, on the activation of complement system pathways and neutrophil chemotaxis, as well as the euphol activity in HRT18, B16F10 and 3T3 cell culture and their possible mechanisms of cell death induction. Assessment of complement by CP and AP pathways was performed using hemolytic and ELISA assays for LP and neutrophil chemotaxis was performed using casein as the chemotactic inducer and Boyden's chamber. Cytotoxicity was evaluated by MTT reduction and neutral red internalization by lysosomes methodologies, IC₅₀ calculation and selectivity index. The mechanisms of cell death were evaluated by fresh and hematologically stained cell morphology; and the cell cycle and transmembrane potential of mitochondria by flow cytometry. All latex fractions of *E. umbellata* and euphol induced an inhibitory effect on AP activation. In CP, methanol and ethyl acetate fractions inhibited activation, and chloroform and euphol extracts activated this pathway. LP was inhibited by the hexane, ethyl acetate and euphol fraction. Neutrophil chemotaxis was inhibited by all latex fractions and euphol. Euphol was also able to induce cell death by the two cytotoxicity methodologies evaluated, however the neutral red internalization technique was more sensitive. IC₅₀ values were 62.7±7.6, 70.7±4.3, 39.0±6.5 µM for B16F10, HRT18 and 3T3, respectively, and the selectivity index 0.62 and 0.55 for B16F10 and HRT18. The morphology of the euphol treated cells showed signs of apoptotic death in both fresh visualization and hematological staining. Cell cycle phase and mitochondrial transmembrane potential analyzes showed no changes when compared to the control group. Thus, it can be concluded that phytocomplex and euphol isolated from *E. umbellata* latex fractions have potential for use in the treatment of complement-related inflammatory diseases and possible application in cancer therapy.

Keywords: *Euphorbia umbellata*. Euphol. Complement system. Chemotaxis. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO PELA VIA CLÁSSICA.....	23
FIGURA 2:	ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO PELA VIA DAS LECTINAS.....	25
FIGURA 3:	ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO PELA VIA ALTERNATIVA.....	26
FIGURA 4:	VIA TERMINAL COMUM DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO E FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE ATAQUE A MEMBRANA.....	27
FIGURA 5:	MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	29
FIGURA 6:	ATIVIDADES RESULTANTES DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	33
FIGURA 7:	CONTRIBUIÇÃO DO COMPLEMENTO PARA A PROGRESSÃO TUMORAL E PRINCIPAIS ALVOS DE BLOQUEIO.....	35
FIGURA 8:	EVENTOS LEUCOCITÁRIOS NA INFLAMAÇÃO.....	37
FIGURA 9:	ESPÉCIE <i>E. umbellata</i> PAX BRUYNS (EUPHORBIACEAE).....	41
FIGURA 10:	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ADOTADO NA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS QUÍMICO E BIOLÓGICO DE <i>E. umbellata</i>	46
FIGURA 11:	COLETA DO LÁTEX DE <i>E. umbellata</i>	47
FIGURA 12:	ASPECTO DA FRAÇÃO 244-254 OBTIDA APÓS REUNIÃO DAS FRAÇÕES COM FATOR DE RETENÇÃO SEMELHANTES.....	60
FIGURA 13:	ESTRUTURA MOLECULAR DO TRITERPENO EUFOL.....	60
FIGURA 14:	ESPECTRO DE RMN DE ¹ H PARA A SUB-FRAÇÃO 244-254.....	61
FIGURA 15:	ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C PARA A SUB-FRAÇÃO 244-254.....	63
FIGURA 16:	CURVA DE TITULAÇÃO DO SHN PARA DETERMINAÇÃO DE AP50 E CH50.....	64
FIGURA 17:	EFEITO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA DO LÁTEX DE <i>E.</i> <i>umbellata</i> NA ATIVAÇÃO DAS VIAS ALTERNATIVA, CLÁSSICA E LECTINAS.....	66
FIGURA 18:	EFEITO DA FRAÇÃO METANOL OBTIDA DO LÁTEX DE <i>E. umbellata</i> NA ATIVAÇÃO DAS VIAS ALTERNATIVA, CLÁSSICA E LECTINAS.....	67
FIGURA 19:	EFEITO DA FRAÇÃO HEXANO OBTIDA DO LÁTEX DE <i>E. umbellata</i> NA ATIVAÇÃO DAS VIAS ALTERNATIVA, CLÁSSICA E LECTINAS.....	68

FIGURA 20: EFEITO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO OBTIDA DO LÁTEX DE <i>E. umbellata</i> NA ATIVAÇÃO DAS VIAS ALTERNATIVA, CLÁSSICA E LECTINAS.	71
FIGURA 21: EFEITO DO TRITERPENO EUFOL OBTIDO DO LÁTEX DE <i>E. umbellata</i> NA ATIVAÇÃO DAS VIAS ALTERNATIVA, CLÁSSICA E LECTINAS.	72
FIGURA 22: EFEITO DAS FRAÇÕES DO LÁTEX DE <i>E. umbellata</i> SOBRE A QUIMIOTAXIA DE LEUCÓCITOS HUMANOS INDUZIDA PELA CASEÍNA.	75
FIGURA 23: VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS 3T3, B16F10 E HRT18 AVALIADA PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EUFOL.	79
FIGURA 24: VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS 3T3, B16F10 E HRT18 AVALIADA PELO MÉTODO DE INTERNALIZAÇÃO DE VN COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EUFOL.	81
FIGURA 25: MORFOLOGIA CELULAR DA LINHAGEM 3T3 APÓS INCUBAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EUFOL.	88
FIGURA 26: MORFOLOGIA CELULAR DA LINHAGEM B16F10 APÓS INCUBAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EUFOL.	89
FIGURA 27: MORFOLOGIA CELULAR DA LINHAGEM HRT18 APÓS INCUBAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EUFOL.	90
FIGURA 28: HISTOGRAMA DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS CÉLULAS B16F10 TRATADAS COM EUFOL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.	93
FIGURA 29: EFEITO DO EUFOL SOBRE A DESPOLARIZAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS DAS CÉLULAS B16F10 COM 24 HORAS DE TRATAMENTO.	95
FIGURA 30: ATIVIDADES BIOLÓGICAS PROPOSTAS PARA O EXTRATOS DE <i>E. umbellata</i> E PARA O EUFOL.	97

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS ISOLADAS NA ESPÉCIE <i>E. umbellata</i> DESCRITAS NA LITERATURA.....	42
QUADRO 2: ATIVIDADES BIOLÓGICAS DESCRITAS NA LITERATURA PARA <i>E.</i> <i>umbellata</i>	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	DESCRIÇÃO DO GRADIENTE DE ELUIÇÃO DA FASE MÓVEL DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA	48
TABELA 2:	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE HIDROGÊNIO OBSERVADOS PARA O COMPOSTO ISOLADO DO LÁTEX DE <i>E. umbellata</i> EM COMPARAÇÃO COM A LITERATURA	61
TABELA 3:	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE CARBONO OBSERVADOS PARA O COMPOSTO ISOLADO DO LÁTEX DE <i>E. umbellata</i> EM COMPARAÇÃO COM A LITERATURA	61
TABELA 4:	IC ₅₀ (μM+DP) DO EUFOL PARA AS CÉLULAS DE MELANOMA (B16F10), CÂNCER COLO RETAL (HRT18) E FIBROBLASTOS 3T3 PELA METODOLOGIA DO VN.	83
TABELA 5:	IC ₅₀ (μM+DP) DO EUFOL PARA AS CÉLULAS DE MELANOMA (B16F10), CÂNCER COLO RETAL (HRT18) E FIBROBLASTOS 3T3 PELA METODOLOGIA DO MTT.....	83
TABELA 6:	ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS LINHAGENS 3T3, B16F10 E HRT18 APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO COM EUFOL.....	87
TABELA 7:	DISTRIBUIÇÃO DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS B16F10 APÓS TRATAMENTO COM EUFOL.....	93
TABELA 8:	PORCENTAGEM DE DESPOLARIZAÇÃO MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS B16F10 APÓS TRATAMENTO DE 24 HORAS COM EUFOL.	95

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

SC	- Sistema complemento
VC	- Via clássica
VA	- Via alternativa
VL	- Via lectina
MBL	- Lectina ligadora a manose
PRM	- Molécula de reconhecimento de padrão
Fc	- Fragmento cristalizável
MAC	- Complexo de ataque à membrana
FI	- Fator I
FH	- Fator H
MCP	- Proteína Cofatora de Membrana
CR	- Receptor de Complemento
DAF	- Fator de aceleração de decaimento
CR	- Receptores do complemento
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
IL	- Interleucina
APC	- Células apresentadoras de antígenos
IC	- Imunocomplexo
SMF	- Sistema monocítico fagocitário
PRCs	- Proteínas reguladoras do complemento
mAb	- Anticorpo monoclonal
PAMPs	- Padrões moleculares associados ao patógeno
DAMPs	- Padrões moleculares associados ao dano
ERO	- Espécies reativas de oxigênio
B16F10	- Células de melanoma murinho
HeLa	- Células de colo de útero
HRT18	- Células de adenocarcinoma colorretal
3T3	- Células de fibroblasto
PKC ϵ	- Proteína C quinase épsilon
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzida
COX	- Ciclooxygenase
CDK	- Ciclina dependente de quinase

CKI	- Inibidores de ciclinas dependentes de quinase
TGFβ	- Transformação do crescimento beta
CC	- Cromatografia em coluna
CCD	- Cromatografia em camada delgada
Rf	- Fator de retenção
SHN	- Soro humano normal
BSA	- Albumina de soro bovino
PBS	- Solução salina tamponada com fosfatos
PNPP	- p-nitrofenil fosfato dissódico
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute
DMSO	- Dimetilsulfóxido
MTT	- brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
VN	- Vermelho neutro
SFB	- Soro fetal bovino
IC50	- Concentração estimada necessária para reduzir em 50% o número de células viáveis
IS	- Índice de seletividade
MTP	- Potencial transmembrânico de mitocôndria
ANOVA	- Análise de variância
CH50	- Complemento hemolítico da via clássica 50%
AP50	- Complemento hemolítico da via alternativa 50%
AR	- Artrite reumatoide
LES	- Lúpus eritematoso sistêmico
TPA	- 12-O-tetradecanoilforbol
EFL1	- Fator Euphorbia L1
ERK	- Quinase controlada pela sinalização extracelular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1	SISTEMA IMUNOLÓGICO	21
3.2	SISTEMA COMPLEMENTO	22
3.2.1	Vias de ativação do Complemento.....	23
3.2.1.1	Via Clássica.....	23
3.2.1.2	Via das Lectinas	24
3.2.1.3	Via Alternativa	25
3.2.1.4	Via do ataque a membrana (Via lítica).....	26
3.2.2	Mecanismos de regulação	28
3.2.3	Atividades resultantes da ativação do Complemento.....	29
3.2.3.1	Lise de membranas	29
3.2.3.2	Opsonização e fagocitose	30
3.2.3.3	Inflamação	30
3.2.3.4	Remoção de células apoptóticas.....	31
3.2.3.5	Interface entre a imunidade inata e adaptativa	31
3.2.3.6	Remoção de complexos imunes	31
3.2.3.7	Papel do complemento no câncer.....	33
3.4	INFLAMAÇÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA	35
3.5	PRODUTOS NATURAIS.....	38
3.6	<i>Euphorbia umbellata</i> (PAX) BRUYNS F.....	40
3.7	EUFOL	44
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	46

4.1	COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DA PLANTA	47
4.2	EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO	47
4.2.1	Obtenção das frações	47
4.2.2	Isolamento Eufol	48
4.2.2	Dados espectroscópicos da identificação de substâncias isoladas	48
4.3	ENSAIOS <i>in vitro</i> AVALIANDO A ATIVIDADE DO SISTEMA COMPLEMENTO (SC)	49
4.3.1	Obtenção de soro humano	49
4.3.2	Preparo das soluções-teste utilizadas nos testes de fixação do complemento	49
4.3.3	Ensaio hemolíticos de fixação do SC	49
4.3.3.1	Preparo das suspensões de eritrócitos de carneiro	49
4.3.3.2	Preparo das suspensões de eritrócitos de coelho	50
4.3.3.3	Titulação do Soro humano normal (SHN)	50
4.3.3.4	Ensaio para avaliação da VC e VA	51
4.3.4	Ensaio de ativação da Via das Lectinas	52
4.4	QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS	52
4.4.1	Preparo das soluções-teste para o ensaio de quimiotaxia de neutrófilos	52
4.4.2	Preparo da solução de caseína a 5% (p/v)	53
4.4.3	Obtenção dos neutrófilos humanos	53
4.4.4	Migração leucocitária <i>in vitro</i>	54
4.5	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E MORTE CELULAR	54
4.5.1	Cultura de células	54
4.5.2	Ensaio de citotoxicidade celular por redução mitocondrial de metil tiazolil tetrazólium (MTT)	54
4.5.3	Ensaio de citotoxicidade por internalização lisossomal de Vermelho Neutro	55
4.5.4	Determinação de IC50	56
4.5.5	Índice de seletividade (IS)	56
4.5.6	Avaliação morfológica através da microscopia óptica	56

4.5.7	Avaliação morfológica por MayGrunwald e Giemsa.....	56
4.5.7	Análise do ciclo celular	57
4.5.8	Análise do potencial transmembrânico de mitocôndria (MTP)	57
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	ENSAIOS FITOQUÍMICOS	59
5.1.2	Extração e isolamento	59
5.2	ENSAIOS <i>in vitro</i> AVALIANDO A ATIVIDADE DO SISTEMA COMPLEMENTO (SC)	64
5.2.1	Ensaio de ativação do SC.....	64
5.2.1.1	Titulação do SHN para os ensaios hemolíticos	64
5.2.1.2	Ensaio de ativação do complemento.....	65
5.3	QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS	73
5.4	ENSAIOS CELULARES	77
5.3.1	Ensaio de citotoxicidade por redução mitocondrial de MTT	78
5.2.2	Ensaio de citotoxicidade por internalização lisossomal de vermelho neutro (VN) ..	80
5.2.3	Avaliação de citotoxicidade por cálculo de IC50.....	83
5.2.4	Índice de Seletividade	85
5.2.5	Ensaio morfológicos	86
5.2.5	Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	92
5.2.6	Análise do potencial transmembrânico de mitocôndria (MTP)	95
6	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

O sistema complemento (SC) é um instrumento complexo de vigilância imunológica que participa da imunidade inata e modula a imunidade adquirida (MERLE et al., 2015a). Consiste em proteínas solúveis, fatores reguladores da superfície e receptores que atuam em conjunto para realizar funções efetoras na homeostase do hospedeiro e na defesa contra patógenos (HAJISHENGALLIS et al., 2017). Normalmente, as proteínas estão inativas, mas são ativadas sob condições particulares por três vias distintas: clássica, alternativa e lectina. Enquanto a ativação da via clássica é induzida quando o componente C1 se liga a complexos imunes, a alternativa ocorre espontaneamente pela hidrólise de C3 ou na presença de microrganismos e a das lectinas é desencadeado na presença de carboidratos (REDDY; SIEDLECKI; FRANCIS, 2017).

A ativação do SC pode desencadear respostas imunes inflamatórias e citolíticas altamente eficientes a organismos infecciosos, tecidos danificados por mecanismos físicos, químicos ou neoplásicos e outras superfícies identificadas como "não próprias", resultando em opsonização, fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios e formação do complexo de ataque à membrana que leva à lise celular (HUBER-LANG et al., 2018; PÉREZ-ROSÉS et al., 2015).

No entanto, a ativação do SC desempenha um duplo papel na doença. Por um lado, a ativação do complemento pode desempenhar funções protetoras na imunidade, tanto como mecanismo de defesa de primeira linha contra patógenos invasores quanto como potencializador da imunidade adquirida. Mas, por outro lado, a ativação do complemento é uma das principais causas de lesão tecidual em muitas condições patológicas (RICKLIN; LAMBRIS, 2013; ROOS et al., 2001). Consequentemente, a imunomodulação do SC representa importante estratégia, especialmente no que se refere à resposta inflamatória.

A pesquisa com produtos naturais imunomoduladores, plantas, seus extratos e suas frações ativas com potencial imunomodulador, podem fornecer valiosos resultados para o desenvolvimento de novos agentes (RIBEIRO et al., 2018). Além disso, o uso potencial de produtos de origem vegetal e substâncias isoladas de plantas também tem sido amplamente discutido (DUTRA et al., 2016; LI; LOU, 2018).

Diversos extratos e metabólitos de plantas, incluindo óleos essenciais, esteroides, terpenoides, compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides, já foram descritos como moduladores do SC, principalmente para as vias clássica e alternativa (BENENCIA et al., 1995; GRIGORE, 2017; JANTAN et al., 2015; MIN et al., 2008; PÉREZ-ROSÉS et al., 2015; RISCO et al., 2003).

A utilização de plantas medicinais estende-se por todos os continentes, variando na disponibilidade vegetal nativa e nos valores culturais e históricos dos povos, e há muito tempo substâncias originadas de fontes naturais são utilizadas no tratamento de inúmeras enfermidades no ser humano (DUTRA et al., 2016; MORAES; ALONSO; OLIVEIRA-FILHO, 2011). Neste sentido, a identificação de compostos bioativos a partir destas plantas medicinais tornou-se uma área muito ativa de pesquisa farmacêutica (YUNES; CECHINEL, 2016).

Desta forma, devido a um potencial papel benéfico das plantas medicinais para a melhoria de várias patogenidades e ainda com o crescente interesse da população mundial em plantas ou derivados destas se faz importante tanto a avaliação fitoquímica dos extratos ou das substâncias obtidas destas espécies vegetais, quanto a sua indicação farmacológica.

Euphorbia umbellata Pax Bruyns, conhecida como janaúba ou leitosinha, é utilizada popularmente na forma de garrafada para o tratamento do câncer, no entanto ainda não existem estudos clínicos que comprovem essa atividade (DUTRA et al., 2016; ORTÊNCIO, 1997). Esta espécie apresenta diversas atividades descritas na literatura como antioxidante, antiulcerogênica, anti-inflamatória, hemostática e citotóxica atribuídas especialmente a compostos fenólicos, glicoproteínas e terpenos (BADGUJAR, 2014; BORGES et al., 2013; KANUNFRE et al., 2017; MINOZZO et al., 2016; MUNHOZ et al., 2014; RAJESH et al., 2007).

O triterpeno tetracíclico eufol é o principal componente dos extratos de plantas do gênero *Euphorbia* (SILVA et al., 2018; YASUKAWA et al., 2000) e algumas ações biológicas são atribuídas a esta substância como analgésica (através da modulação da via da proteína C quinase), anti-inflamatória (regulando a liberação de mediadores inflamatórios) e citotóxica em algumas linhagens celulares (modulando a expressão de ciclinas e induzindo apoptose) (CHEN et al., 2015; DUTRA et al., 2015; LIN et al., 2012; PASSOS et al., 2013; WANG et al., 2013).

Apesar dos efeitos biológicos já descritos, não há relatos na literatura sobre a modulação do sistema imune por plantas do gênero *Euphorbia* ou por substâncias isoladas a partir delas. Assim, considerando que é descrito na literatura atividades citotóxica e anti-inflamatória para o látex e os extratos de *E. umbellata* e que o complemento é o principal mediador humoral do processo inflamatório e apresenta uma significativa ação na progressão e desenvolvimento tumoral, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das frações do látex de *E. umbellata* e do eufol na ativação das três vias do complemento, na quimiotaxia de neutrófilos e a atividade citotóxica do eufol em culturas de células cancerígenas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biológico dos extratos de *E. umbellata* Pax Bruyns e do triterpeno isolado eufol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o fracionamento do látex de *E. umbellata*;
- Isolar o triterpeno eufol do látex de *E. umbellata*;
- Avaliar a atividade das frações do látex e do eufol na ativação das vias alternativa, clássica e lectina do sistema complemento;
- Avaliar as frações do látex e o eufol na atividade migratória de neutrófilos *in vitro*.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do eufol em culturas de célula HRT18 (tumor de cólon), B16F10 (melanoma murino) e 3T3 (fibroblasto);
- Comparar a toxicidade visualizada em células cancerígenas com as células não cancerígenas;
- Avaliar os indícios do tipo de morte celular induzidos pelo eufol.
- Determinar o ciclo celular e avaliar o potencial transmembrana da linhagem cancerígena mais responsiva ao eufol;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO

A resposta imune é controlada pela interação direta de diferentes tipos de células (linfóides: linfócitos B e T, mielóides: neutrófilos, basófilos, monócitos, macrófagos) e por produtos de síntese (imunoglobulinas, citocinas: interleucinas, fatores estimuladores de colônias, fatores de crescimento e interferons), e é uma das funções mais complexas do organismo, envolvendo a cooperação desses elementos para se defender contra qualquer agressão (GRIGORE, 2017; WITT; SCHMIDTMANN, 1968).

O sistema imunológico é dividido em dois tipos de imunidade que caracterizam dois tipos de respostas: sistema imune inato (sistema imune inespecífico) e sistema imune adaptativo (sistema imune específico ou adquirido). O sistema imune inato atua com duas partes efetoras de ação imediata: o sistema complemento e o sistema celular. Já o sistema imune adaptativo é formado por linfócitos T e B contra antígenos específicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A imunidade inata não tem capacidade para memória imunológica e emprega um mecanismo de defesa independente do antígeno que fornece defesa do hospedeiro imediatamente ou dentro de horas após a exposição a patógenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Várias estruturas moleculares expressas por patógenos ativam a resposta imune inata por interação com diferentes receptores, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões, e os principais mediadores do sistema imune inato que fornecem defesa instantânea incluem citocinas, proteínas de fase aguda, macrófagos, monócitos, complemento e neutrófilos (JANTAN et al., 2015; WITT; SCHMIDTMANN, 1968).

Além disso, a imunidade inata pode estimular a resposta imune adaptativa com a ajuda de um grupo de células especializadas conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como as células dendríticas (DCs). As APCs exibem o antígeno processado para os linfócitos e colaboram com eles para induzir a resposta adaptativa (GRIGORE, 2017).

Ao contrário da imunidade inata, a resposta imune adaptativa envolve anticorpos específicos para o antígeno, e um certo intervalo de tempo é necessário para que a resposta máxima seja alcançada após a exposição ao antígeno. As respostas adaptativas são principalmente conduzidas por células T, facilitadas por APCs na imunidade mediada por células e por células B na imunidade mediada por anticorpos (GRIGORE, 2017; JANTAN et al., 2015).

3.2 SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento (SC) é assim chamado porque “complementa” a ação das células do sistema imune inato para a destruição dos microrganismos além de modular a resposta humoral (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). É composto por mais de 50 proteínas circulantes e associadas a membranas celulares, incluindo moléculas efetoras, receptores e reguladores, sendo ativadas em cascata onde uma proteína ativa a próxima (SCHMIDT; LAMBRIS; RICKLIN, 2017). As proteínas do complemento geralmente são designadas por uma letra C maiúscula e são inativas até serem clivadas em fragmentos (produtos). As proteínas são numeradas de C1 a C9, nomeadas pela ordem em que foram descobertas. Os fragmentos são proteínas ativas e são indicados pelas letras a (fragmentos menores) e b (fragmentos maiores) minúsculas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O SC possui importante papel na resposta imunológica e inflamatória contribuindo de forma substancial para a homeostase do organismo (ALEGRETTI et al., 2009). As funções fisiológicas do complemento incluem opsonizar bactéria aumentando a fagocitose; recrutar e ativar várias células incluindo células polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos; pode participar na regulação de respostas mediadas por anticorpos e pode auxiliar na eliminação de complexos imunológicos e células apoptóticas (MERLE et al., 2015a).

No entanto, um desequilíbrio no complemento, seja por atividade insuficiente ou excessiva, pode ter consequências patológicas importantes, induzindo dano tecidual e disfunção orgânica no hospedeiro, e provocando vários distúrbios como as doenças inflamatórias/autoimunes, aumento de suscetibilidade a infecções, doenças renais, câncer, entre outros (HAJISHENGALLIS et al., 2017; HAUER et al., 2019; LAPPEGÅRD et al., 2014; ZHANG et al., 2017).

Existem três mecanismos de ativação do complemento, as vias: clássica (VC), alternativa (VA) e lectina (VL). As três vias do complemento compartilham em comum a ativação do componente central C3, mas diferem de acordo com seus mecanismos de iniciação e reconhecimento do alvo (SAYEGH; BLOCH; PARSA, 2014). A VC é ativada via complexos antígeno-anticorpo; a alternativa, através de hidrólise espontânea de C3 no plasma; e a da lectina, via ligação da lectina ligadora a manose (MBLs) à superfícies bacterianas com polissacarídeos contendo manose (AFSHAR-KHARGHAN, 2017).

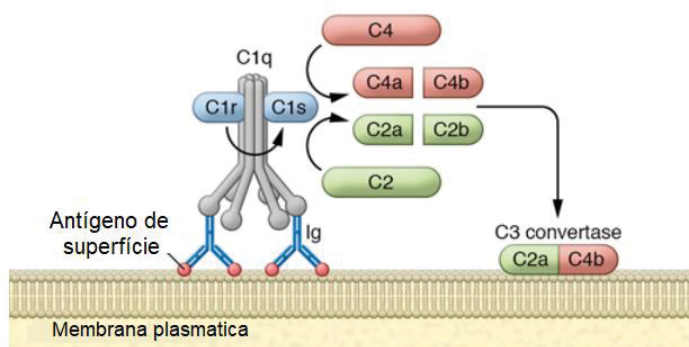
3.2.1 Vias de ativação do Complemento

3.2.1.1 Via Clássica

A ativação da VC ocorre na presença de anticorpos secretados durante uma resposta imune humoral ou ainda anticorpos naturais que podem se ligar a epítomos antigênicos, formando complexo-imunes. Além dessa forte iniciação por agregados de anticorpos, a molécula de reconhecimento de padrão (PRM), C1q, ativa o complemento reconhecendo outras estruturas distintas diretamente em células microbianas e apoptóticas ou através de PRM endógenos como imunoglobulinas e petraxinas (Proteína C reativa, por exemplo) (RICKLIN et al., 2011).

A proteína C1 é multi-subunitária composta de uma subunidade C1q, associada a duas moléculas C1r e duas moléculas C1s por ligações dependentes de cálcio. Essa proteína se liga à região do fragmento cristalizável (Fc) das moléculas de anticorpo fixadores de complemento (Imunoglobulinas G e M) que interagiram com antígeno, na presença de cálcio e magnésio. A ligação de C1 ao anticorpo é via C1q, a ligação de C1q leva à ativação de C1r que por sua vez ativa C1s, os íons Cálcio são essenciais a fim de prevenir a dissociação de C1-esterase de C1q. O resultado é a formação de uma “C1qrs” ativada (Complexo C1), que é uma enzima que cliva C4 e C2 em dois fragmentos C4a e C4b e C2 em C2a e C2b, respectivamente. Os fragmentos C4b e C2a se ligam a membrana na presença de magnésio e os fragmentos C4a e C2b são liberados no microambiente. O complexo resultante C4bC2a é uma C3 convertase (FIGURA 1) (LUNG et al., 2018; MERLE et al., 2015a).

FIGURA 1: ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO PELA VIA CLÁSSICA.



FONTE: Adaptado de Afshar-Khargha, 2017.

Esse complexo (C4bC2a) é responsável pela clivagem das moléculas de C3, componente central das três vias de ativação do SC. A partir da clivagem de C3 são formados os fragmentos C3a e C3b (MAMIDI; HÖNE; KIRSCHFINK, 2017). As moléculas de C3b formadas através da VC podem servir de substrato para a ativação da VA. Este mecanismo é chamado de alça de amplificação (MERI, 2016).

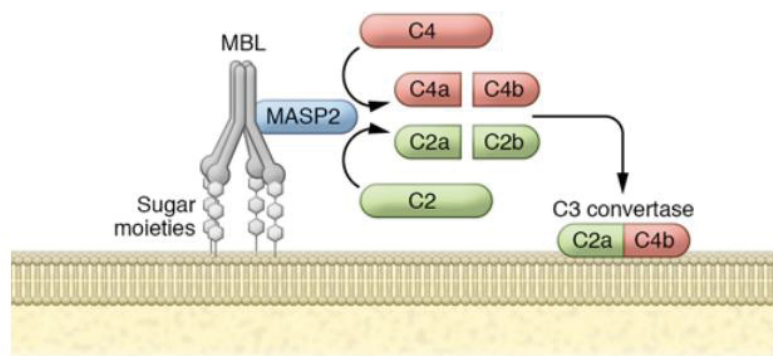
3.2.1.2 Via das Lectinas

A VL é homóloga a VC, sendo diferenciadas pelo mecanismo de ativação. As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos e esta via é ativada quando moléculas PRMs, como MBLs, ficolinas e colectinas, se ligam a carboidratos e grupos acetilados que são comuns em microrganismos, incluindo bactérias, vírus e protozoários (BELTRAME et al., 2015).

As PRMs são estruturalmente semelhantes à molécula de C1q e, por esse motivo, a VL é semelhante à VC. Envolvendo também as moléculas C2 e C4, com posterior formação do complexo C3 convertase (C4b2a) (MERLE et al., 2015a).

As PRM encontram-se associadas à serino proteases associadas à MBL (MASP1 e MASP2) que após sua ligação ao microrganismo alvo, tornam-se ativas. MASP-1 cliva C3 diretamente e MASP-2 expressa atividade enzimática similar a C1s que resulta em uma clivagem sequencial de C4 e C2. O fragmento C4b gerado liga-se covalentemente a superfície microbiana e subsequentemente interage com C2 que também será clivado por MASP-2. O complexo C4b2a criado expressa atividade de C3 convertase similar a C3 convertase gerada na VC. A seguir esse complexo é capaz de gerar o fragmento C3b através de sua ação enzimática sobre C3 amplificando a ativação do SC (FIGURA 2) (LUNG et al., 2018; MAMIDI; HÖNE; KIRSCHFINK, 2017).

FIGURA 2: ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO PELA VIA DAS LECTINAS.



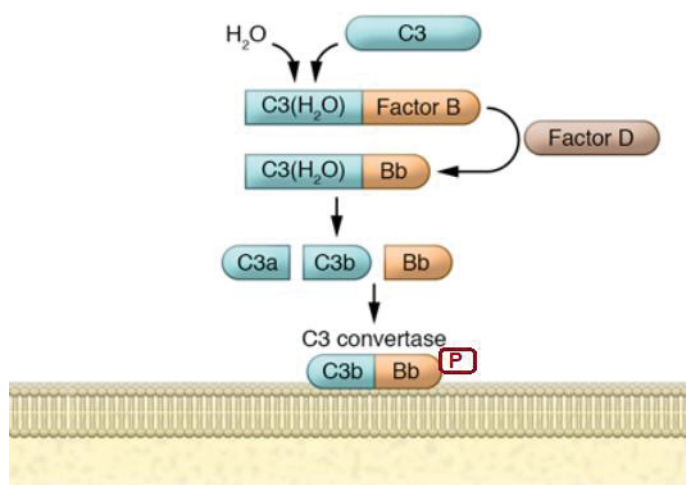
FONTE: Adaptado de Afshar-Khargha, 2017.

3.2.1.3 Via Alternativa

A VA pode ser ativada pela presença de certos agentes como determinados fungos e bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos com determinadas características, especialmente a ausência de ácido siálico na membrana, a presença de lipopolissacarídeos, comum em várias bactérias, e as proteínas da superfície viral e de parasitas (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

Além disso, essa via é auto-ativada de forma contínua e em níveis basais pela hidrólise espontânea de C3 a C3(H₂O). Após a hidrólise, C3(H₂O) sofre uma mudança que expõe um sítio de ligação para o Fator B (FB) na presença de magnésio. O FB ligado a C3(H₂O) é então clivado por um Fator D (FD) permitindo a formação de um complexo C3 convertase, C3(H₂O)Bb. Esse complexo é capaz de interagir e clivar moléculas C3 em C3a e C3b. Assim como o C3(H₂O), C3b também apresenta sítio de ligação com o FB formando o complexo C3bB. O fator D que circula como enzima ativa, atua então na porção B da molécula para formar C3bBb, molécula lábil, sendo estabilizada pela agregação de uma molécula de properdina (P) (FIGURA 3) (MERLE et al., 2015a).

FIGURA 3: ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO PELA VIA ALTERNATIVA.



FONTE: Adaptado de Afshar-Khargha, 2017.

A enzima C3bBbP resultante é denominada de C3-convertase de amplificação da VA, clivando a seguir novas moléculas de C3 em C3a e C3b, sendo que este último pode ingressar na chamada "alça de amplificação", oferecendo mais C3b para a fase inicial desta via, ou se ligar ao complexo molecular C3bBb para formar C3bBb(C3b), denominada de C5-convertase da VA que, assim como C4b2a3b da VC, cliva C5 em C5a e C5b (MAMIDI; HÖNE; KIRSCHFINK, 2017).

C3b contém um grupo tioéster altamente reativo que é exposto após a clivagem de C3, resultando na deposição de C3b em qualquer molécula ou superfície celular nas proximidades (MERLE et al., 2015a). A presença de certos agentes como determinados fungos e bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos, são capazes também de ativar a VA, através da ligação de uma ou mais moléculas de C3b na sua superfície (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

Tanto a VC como a VL também ativarão a VA uma vez formada a C3b. Assim a VA tem um papel fundamental como uma alça de amplificação dentro do sistema do complemento, sendo que cerca de 80% da ativação total do complemento foi atribuída a este circuito de amplificação (SANCHEZ-CORRAL et al., 2018).

3.2.1.4 Via do ataque a membrana (Via lítica)

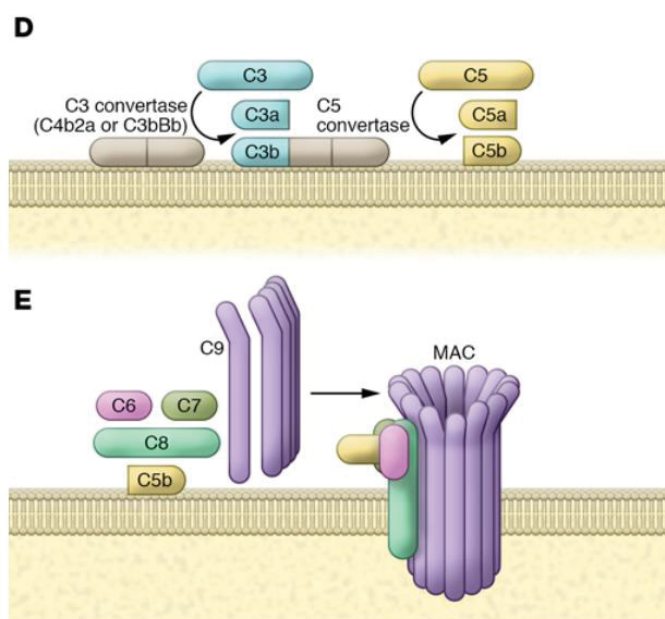
As três vias de ativação convergem para a geração de enzimas proteolíticas, denominadas C3 convertases, que clivam a proteína C3 em C3a e C3b. C3a é liberada no microambiente agindo como uma potente anafilotoxina e o fragmento C3b gerado se combina

com a C3 convertase (C4bC2a ou C3bBb), dando origem a C5 convertase (C4bC2aC3b para VC e VL e C3bBbC3b para VA) que cliva C5 em C5a e C5b (AFSHAR-KHARGHAN, 2017).

Semelhante ao C3a, mas ainda mais forte, o C5a atua como uma anafilatoxina, enquanto o C5b se associa à superfície-alvo e recruta C6 e C7 para formar o complexo de inserção C5b7; após esta etapa ocorre o recrutamento de C8 e múltiplas unidades de C9 na membrana da célula alvo, para formar a estrutura semelhante a poros do complexo de ataque à membrana (MAC) (ALEGRETTI et al., 2012).

A unidade funcional do MAC é um poro inserido na bicamada fosfolipídica que interfere na propriedade de permeabilidade seletiva da membrana. A inserção de múltiplos MACs leva à morte celular causada por influxo de cálcio, de água, íons e pequenas moléculas para o citosol da célula-alvo, levando a sua ruptura (FIGURA 4) (MAMIDI; HÖNE; KIRSCHFINK, 2017).

FIGURA 4: VIA TERMINAL COMUM DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO E FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE ATAQUE A MEMBRANA



NOTA: Via terminal comum (D) e formação do MAC (E)
FONTE: Adaptado de Afshar-Khargha, 2017.

Os fragmentos menores, liberados durante a ativação da cascata, têm efeitos biológicos importantes. C2a e C4a estão relacionados a mudanças na permeabilidade vascular, Bb está relacionado à ativação dos macrófagos, C3a, C4a e C5a induzem ativação de mastócitos e neutrófilos, enquanto C5a estimula a motilidade e a adesão dos neutrófilos ao foco inflamatório. Já os fragmentos C3b e C4b funcionam como opsoninas, intensificando o processo de

fagocitose pela interação com o receptor de complemento, presente na superfície dos fagócitos (WITT; SCHMIDTMANN, 1968).

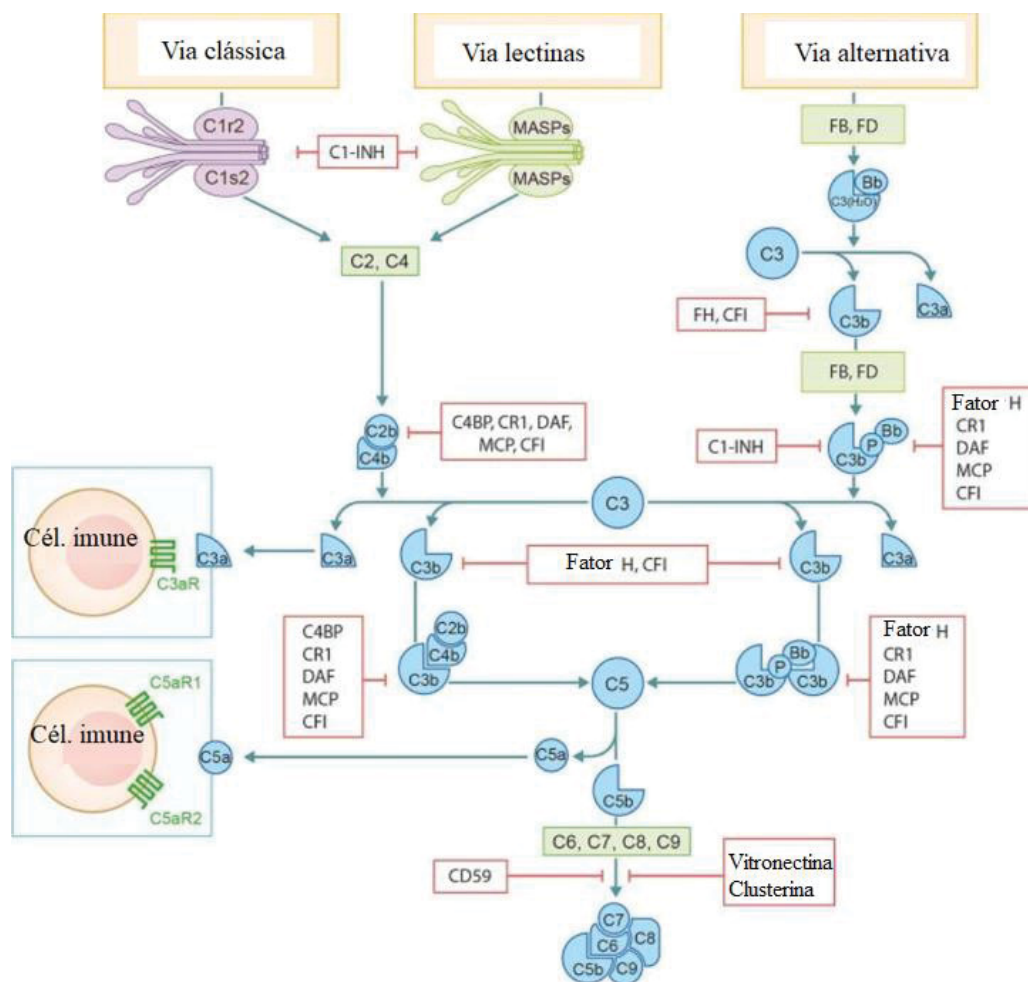
3.2.2 Mecanismos de regulação

Em condições fisiológicas e a fim de evitar um dano deletério ao tecido circundante, o SC é rigidamente regulado por proteínas solúveis e ligadas à membrana (MERLE et al., 2015a). A regulação do complemento precisa controlar todos os principais pontos de checagem de ativação, amplificação e funções efetoras resultantes e cobrir tanto a ativação de fase fluida quanto a de superfície (SCHMIDT; LAMBRIS; RICKLIN, 2017).

Os reguladores plasmáticos incluem o inibidor de C1 que é uma proteína plasmática que impede a iniciação do complemento pelas VC e VL, liga-se a C1r, C1s e MASP-2 e impede a clivagem adicional de C4, a proteína de ligação a C4b (C4BP) inativa a C3 convertase da VC e o Fator I (FI), uma serina protease regula todas as vias, clivando C3b e C4b. Sua atividade requer a presença de cofatores como o Fator H (FH), Proteína Cofatora de Membrana (MCP), Receptor de Complemento 1 (CR1) ou C4bp (LUBBERS; ESSEN, 2017; MAMIDI; HÖNE; KIRSCHFINK, 2017). Por fim, o Fator H (FH) representa o principal regulador da VA graças a três funções regulatórias: dissociação da C3 convertase, prevenção de sua formação e atividade de cofator (EDWARDS et al., 2019; MERLE et al., 2015b).

De igual importância estão os reguladores do complemento ligados à membrana em todas as células circulantes, que impedem a ativação do complemento em sua superfície. CD46 (cofator de membrana) facilita a inativação mediada pelo FI de C3b e C4b, CD55 (fator de aceleração de decaimento/DAF) e receptor complemento 1 (CR1/CD35) interagem com membranas que ligam C3b e C4b e previnem a formação da C3 convertase na superfície celular. O CD59 (protectina), bem como os reguladores solúveis clusterina e vitronectina inibem a formação do MAC na membrana celular, interferindo com a montagem do complexo C5b-9 (FIGURA 5) (SANCHEZ-CORRAL et al., 2018).

FIGURA 5: MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO



FONTE: Adaptado de Edwards et al., 2019.

3.2.3 Atividades resultantes da ativação do Complemento

O complemento está envolvido tanto com lise (decorrente da inserção do MAC na célula alvo) como com a ligação dos produtos de ativação a receptores de membrana específicos presentes em diferentes tipos de células. Assim, além de uma ação efetora contra patógenos, o complemento tem outras atividades biológicas no organismo, como opsonização e fagocitose, solubilização e remoção de complexos imunes e de células apoptóticas, interface entre a imunidade inata e adaptativa e ação pró inflamatória (ALEGRETTI et al., 2012).

3.2.3.1 Lise de membranas

A ativação e amplificação do complemento cria uma variedade de efeitos potentes. O MAC com seu poro lítico é provavelmente o mais reconhecido desses efetores. No entanto,

nem todas as células são igualmente suscetíveis ao MAC, e a lise rápida induzida pelo MAC ocorre principalmente em eritrócitos envelhecidos e em certas bactérias Gram-negativas. Nas células nucleadas, a formação deste complexo é rigidamente regulada, os complexos montados são ativamente removidos da membrana, e os efeitos líticos do MAC são neutralizados pelas bombas de íons (RICKLIN; REIS; LAMBRIS, 2016).

3.2.3.2 Opsonização e fagocitose

A atração mediada por quimiocinas é um pré-requisito importante para a fagocitose, assim, os fragmentos C3a, e especialmente C5a, são poderosos quimiotáticos que atraem neutrófilos, monócitos e macrófagos em direção aos locais de ativação do complemento (AJONA; ORTIZ-ESPINOSA; PIO, 2019). O papel do complemento na eliminação de patógenos através da fagocitose é indireto, e consiste na deposição de fragmentos de complemento na superfície de alvos patogênicos, a chamada opsonização, que permite seu reconhecimento, ingestão e destruição por células fagocíticas, neutrófilos, monócitos e macrófagos (MERLE et al., 2015b).

A principal opsonina do complemento é o componente C3, através das moléculas de C3b e iC3b ligadas, covalentemente, à superfície celular, mais especificamente a receptores de fagócitos como neutrófilos e monócitos/macrófagos. Dessa forma, promovem a fagocitose por meio da interação de opsoninas com receptores do complemento (CR). C3b liga-se ao receptor CR1 e iC3b aos receptores CR3 e CR4, essas interações permitem a aderência de microrganismos aos fagócitos do hospedeiro, levando à sua ingestão e consequente destruição através das enzimas lisossomais (RICKLIN et al., 2011).

3.2.3.3 Inflamação

As anafilotoxinas C3a e C5a são os pequenos fragmentos constantemente liberados após a clivagem de C3 e C5 durante a ativação do SC, além de serem potentes anafilotoxinas, atuam como potentes fatores pró-inflamatórios. As anafilatoxinas funcionam de várias maneiras para induzir a inflamação: promovem a permeabilidade vascular pela indução da liberação de histamina, atuam como fatores quimiotáticos para os leucócitos e estimulam a produção de mediadores inflamatórios, como o TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), IL-1 (interleucina 1) e IL-6 (interleucina 6) (AJONA et al., 2019).

3.2.3.4 Remoção de células apoptóticas

O SC desempenha ainda um importante papel na remoção de células apoptóticas, mediada pela opsonização com C1q e subsequente remoção pelos macrófagos. A ativação do complemento ocorre em células apoptóticas devido a modificações moleculares e estruturais na superfície da célula levando a expressão de sinalizadores para fagocitose. Os fagócitos reconhecem esses sinais e executam a degradação de células apoptóticas sem produzir uma resposta imunológica (RICKLIN et al., 2011).

Para que isso ocorra, as proteínas iniciadoras da VC ou VL interagem com os receptores nas células fagocíticas (células dendríticas imaturas ou macrófagos), e, além disso, recrutam reguladores, que inibem a amplificação da ação do complemento, protegendo assim as células da lise necrótica e o hospedeiro da inflamação indesejada (MERLE et al., 2015b).

3.2.3.5 Interface entre a imunidade inata e adaptativa

Outra função do complemento é participar da interação entre a imunidade inata e a adaptativa. A opsonização via complemento (C3b) facilita a ativação de células B modulada por receptores, especialmente CR2, favorecendo assim a interação dessa célula com antígenos e sua subsequente ativação especialmente no início da resposta imune quando quantidades limitadas de antígeno estão disponíveis (RICKLIN; REIS; LAMBRIS, 2016).

Além disso, melhora também a interação entre as APCs e as células T devido a produção de anafilotoxinas (C3a e C5a). As APCs expressam receptores C3aR e C5aR, ambos essenciais para sua maturação e diferenciação e para a apresentação efetiva de antígenos às células T. A célula T, por sua vez, expressa receptores C5aR que são necessários para sua proliferação. A produção robusta de anticorpos contra patógenos melhora a resposta imune inata, facilitando a ativação do complemento mediada por C1q (AFSHAR-KHARGHAN, 2017).

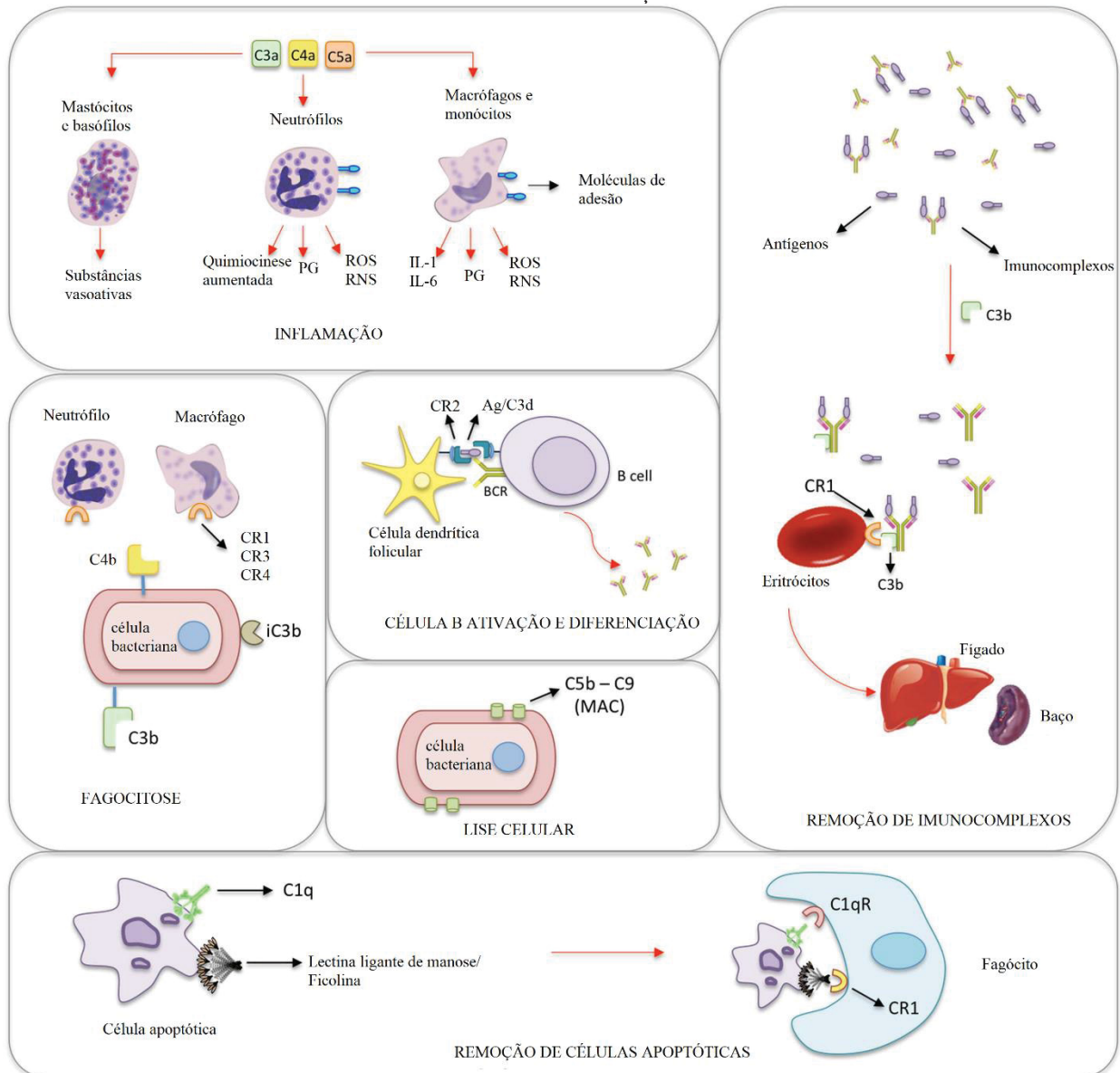
3.2.3.6 Remoção de complexos imunes

A formação de imunocomplexos (IC) circulantes, devido à interação de antígenos com anticorpos específicos, é um importante mecanismo de defesa do organismo. Esta reação, geralmente, é acompanhada por reações secundárias, para neutralizar e eliminar microrganismos e substâncias estranhas. A inativação e eliminação destes antígenos impedem

que eles sejam depositados e causem danos aos tecidos do hospedeiro (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 2013).

A dinâmica destes processos envolve o SC com a ativação da via clássica promovida pelos ICs. A incorporação das proteínas do complemento à rede de antígeno-anticorpo, permite a ligação destes complexos ao receptor para complemento (CR1) dos eritrócitos. Assim, os ICs podem ser transportados na circulação até serem transferidos para os macrófagos teciduais do sistema monocítico fagocitário (SMF) do fígado e baço. A ineficiência destes mecanismos pode levar à deposição dos complexos antígeno-anticorpo nos tecidos, sustentando um processo inflamatório com consequente lesão tecidual (FIGURA 6) (MURPHY, 2014).

FIGURA 6: ATIVIDADES RESULTANTES DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO



FONTE: Adaptado de Beltrame et al., 2015

3.2.3.7 Papel do complemento no câncer

Além das modificações genéticas e epigenéticas que podem estimular a proliferação desenfreada de células cancerígenas e sua resistência à morte, o microambiente tumoral também age como um promotor-chave da tumorigênese por desencadear e apoiar processos locais de inflamação, angiogênese e metástase (PIO; AJONA; LAMBRIS, 2013).

A contribuição do complemento para a fisiopatologia do câncer é bastante complexa e dependendo de vários fatores, como a origem celular do tumor, sua capacidade inerente de produzir proteínas do complemento, a natureza do microambiente tumoral e a magnitude da ativação do complemento (REIS et al., 2018).

Células que expressam antígenos não próprios, células apoptóticas e detritos celulares são detectados e removidos pelo SC. No entanto, as células cancerosas, expressam em sua maioria as mesmas proteínas que suas contrapartes de células normais, embora ocasionalmente com uma densidade diferente (AFSHAR-KHARGHAN, 2017; BERRAONDO et al., 2016).

Na resposta citotóxica desencadeada por células imunes inatas, as células tumorais ativam o complemento através do reconhecimento de antígenos associados a tumores por iniciadores de complemento (por exemplo, C1q), e na sequência ocorre eliminação das células tumorais opsonizadas através da ação combinada de anticorpos direcionados a tumores e complemento (REIS et al., 2018).

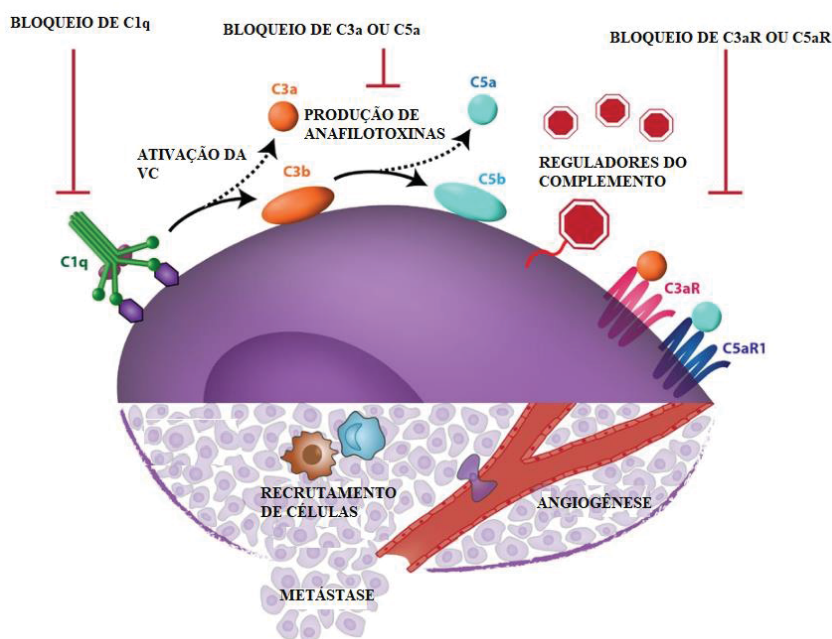
No entanto, várias células tumorais, especialmente os tumores sólidos, desenvolveram diversos mecanismos pelos quais podem limitar a atividade citotóxica dependente de complemento nas suas superfícies. Por exemplo a expressão de proteínas reguladoras do complemento ligadas à membrana, limitando assim a opsonização de C3 para níveis abaixo do limiar necessário para a ativação da via terminal e montagem do MAC, bloqueando a atividade citotóxica e impedindo os efeitos da ativação do complemento (BERRAONDO et al., 2016; REIS et al., 2018; SAYEGH; BLOCH; PARSA, 2014).

Assim, um equilíbrio sutil entre a ativação do complemento e a regulação dentro do microambiente tumoral resulta em uma ativação persistente e controlada do complemento associado ao tumor que representa uma fonte constante de efetores, como C5a ou C3a, que geram um microambiente favorável para a progressão do tumor, além disso, as proteases ligadas às membranas das células cancerígenas também podem clivar C5 e gerar C5a sem ativação do complemento (AJONA et al., 2019; HAJISHENGALLIS et al., 2017).

Os receptores das anafilatoxinas C3a e C5a (C3aR e C5aR, respectivamente) presentes nas células cancerígenas vão contribuir para a progressão e metástase tumoral. A ativação do C5aR em células cancerígenas, diminui a apoptose e aumenta a proliferação celular e a ativação do C3aR desempenha um papel importante na orientação de migração celular e transição epitelial-mesenquimal, ambos os mecanismos importantes na metástase (AFSHAR-KHARGHAN, 2017; BERRAONDO et al., 2016).

Todos esses mecanismos contribuem para a progressão tumoral e apontam C1q, C5a, C3a e as PRCs (proteínas reguladoras do complemento) como potenciais alvos terapêuticos no câncer (BERRAONDO et al., 2016) (FIGURA 7).

FIGURA 7: CONTRIBUIÇÃO DO COMPLEMENTO PARA A PROGRESSÃO TUMORAL E PRINCIPAIS ALVOS DE BLOQUEIO.



FONTE: Adaptado de Berraondo et al., 2016.

Além disso, entre as terapias alvo atualmente exploradas, a imunoterapia baseada no anticorpo monoclonal (mAb) ganhou considerável atenção como uma modalidade terapêutica viável e tem mostrado resultados promissores, particularmente no tratamento de certas neoplasias hematológicas, como os linfomas de células B, mieloma múltiplo e leucemia linfocítica crônica (REIS et al., 2018). Esta terapia é baseada na atividade citotóxica do complemento para a destruição tumoral, assim, esses anticorpos ativam o complemento na superfície das células tumorais e aumentam sua destruição e eliminação (HAJISHENGALLIS et al., 2017).

3.4 INFLAMAÇÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória, um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis, além de apresentar como sinais clínicos característicos rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A finalidade desse processo é remover o estímulo indutor da resposta e iniciar a recuperação tecidual local (HERNÁNDEZ-LEMUS; SOTO; ROSALES, 2018). Durante a inflamação, vários sistemas bioquímicos, como a cascata do SC e da coagulação, são ativados, auxiliando no

estabelecimento, evolução e resolução do processo. Adicionalmente, substâncias solúveis de meia-vida curta são liberadas, exercem sua ação e são degradadas. Em geral, o sucesso na remoção do estímulo desencadeador leva ao término da resposta aguda e reparo tecidual completo (WITT; SCHMIDTMANN, 1968).

De modo geral, a inflamação consiste em indutores, sensores, mediadores e efetores. Os indutores podem ser organismos infecciosos ou estímulos não infecciosos, como toxinas, corpos estranhos, sinais de células necróticas e tecidos danificados. Sensores são moléculas especializadas ativadas pelos indutores, que acionam a produção de mediadores. Os mediadores são substâncias químicas endógenas que podem induzir a sensação de dor, podem promover ou inibir a inflamação e a reparação de tecidos e podem ativar os efetores - tecidos e células (VARELA et al., 2018).

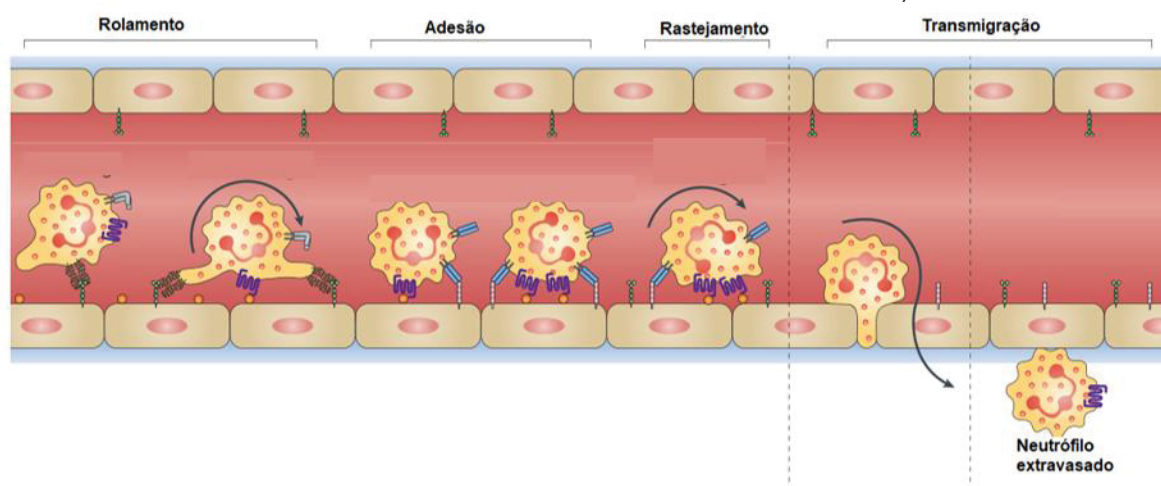
Os indutores podem ser padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), que são padrões moleculares de organismos infecciosos e, padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), moléculas liberadas das células danificadas do hospedeiro. Cada um desses padrões é reconhecido por diferentes receptores em macrófagos e células dendríticas. Após estimulação desses receptores citocinas inflamatórias são liberadas, que incluem TNF- α , IL-1 e IL-6 (MEDZHITOV, 2008).

Esses mediadores inflamatórios induzem alterações no endotélio vascular e atuam como quimioatraentes fazendo com que os leucócitos circulantes no sangue periférico se aproximem do endotélio (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

Os neutrófilos são as primeiras células que são em poucos minutos recrutadas para locais inflamados durante uma resposta imune inata a danos e/ou infecções nos tecidos. No entanto, para uma defesa eficiente do hospedeiro durante uma lesão inflamatória, eles precisam atingir as regiões alvo. Para essa resposta eficaz, eles podem detectar gradientes químicos extracelulares e avançar em direção a concentrações mais altas. Esse processo é conhecido como quimiotaxia ou migração celular guiada (PETRI; SANZ, 2018).

Nesse processo de recrutamento de leucócitos observa-se as etapas de rolamento, adesão, rastejamento e, finalmente, a transmigração do leucócito para o tecido (FIGURA 8). Após migração, os leucócitos extravasados, continuam a migrar para o foco inflamatório através de estímulos químicos. (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

FIGURA 8: EVENTOS LEUCOCITÁRIOS NA INFLAMAÇÃO.



FONTE: Adaptado de Kolaczowska; Kubes, 2013.

Os leucócitos liberam enzimas que combatem organismos infecciosos e ainda fazem fagocitose removendo as células mortas. Como consequência dessa liberação enzimática, espécies reativas de oxigênio (ERO) se acumulam nos tecidos podendo danificar células saudáveis. As células endoteliais também liberam citocinas pró-inflamatórias que atraem ainda mais células inflamatórias. O plasma também se transloca para os tecidos adjacentes, levando ao edema tecidual. As plaquetas em circulação são ativadas e agregadas, enquanto a síntese de proteínas anticoagulantes é reduzida. Isso pode levar à trombose intravascular, que, em excesso, pode contribuir para a disfunção orgânica (VARELA et al., 2018).

O estágio final da inflamação é o reparo tecidual, o processo pelo qual os tecidos substituem as células mortas ou danificadas. O reparo inicia durante a fase ativa da inflamação, porém não pode ser terminado até que todas as substâncias nocivas tenham sido removidas do local da lesão (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Na maioria dos casos, a inflamação é uma resposta imune específica e autocontrolada, orquestrada para resolver infecções ou reparar tecidos e feridas. No entanto, a inflamação pode produzir uma resposta desregulada ou pode estar associada a uma interrupção na homeostase dos processos fisiológicos sem uma conexão direta com os gatilhos clássicos da inflamação. Dessa forma, a resposta inflamatória pode causar danos sistêmicos crônicos que resultam em distúrbios inflamatórios como artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal, psoríase e doenças imuno-inflamatórias. Além disso, a inflamação crônica também está ligada a várias etapas da tumorigênese e é reconhecida como fator de risco para a ocorrência de diferentes tipos de cânceres (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019; PATIL et al., 2019; WITT; SCHMIDTMANN, 1968).

O tratamento dessas doenças ainda é um desafio. Embora vários agentes sejam acessíveis para tratar essas doenças inflamatórias, seu uso prolongado leva a efeitos adversos graves. As drogas sintéticas atualmente disponíveis apresentam efeitos colaterais indesejáveis devido a toxicidade e, ainda, recorrência dos sintomas na descontinuação do uso (CAIN; CIDLOWSKI, 2017; PRESIBELLA; SANTOS; WEFORT-SANTOS, 2003). De modo que o uso de plantas tradicionalmente usadas como anti-inflamatórias para a busca de novas moléculas potencialmente ativas vem se mostrando como uma alternativa promissora (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016).

3.5 PRODUTOS NATURAIS

Substâncias originadas de fontes naturais há muito tempo são utilizadas no tratamento de inúmeras enfermidades no ser humano e, no Brasil, a utilização de plantas medicinais está, em sua maioria, fundamentada no uso popular que foi sendo acumulado e passado empiricamente de geração para geração (DUTRA et al., 2016; MORAES; ALONSO; OLIVEIRA-FILHO, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 80% da população mundial utiliza plantas para tratar enfermidades, baseando-se em uma história de utilização prolongada (BRASIL, 2016).

Tradicionalmente, acredita-se que o uso de plantas no tratamento de doenças é seguro, barato e eficaz, sendo essas, muitas vezes, utilizadas no tratamento de doenças crônicas associadas com medicamentos convencionais. No entanto, a utilização de plantas na terapêutica deve ser restrita a plantas conhecidas e/ou corretamente identificadas, pois podem ocorrer intoxicações com o uso de algumas espécies vegetais, provocando graves acidentes (CAMPOS et al., 2016b).

Desta forma é fundamental o estudo de plantas medicinais para avaliar as características de seus extratos, sua segurança e eficácia, através da avaliação de suas ações por testes farmacológicos e toxicológicos em cultura de células e animais e, finalmente, a análise da eficácia e segurança no homem (ATANASOV et al., 2015). Estes estudos têm a finalidade de avaliar a ideia errônea de que produtos oriundos de plantas medicinais (plantas, extratos e fitoterápicos), por serem naturais, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos, e que o uso popular destes serve como validação da eficácia (CAMPOS et al., 2016b). Além disso, grande parte dos medicamentos encontrados no mercado derivam direta ou indiretamente de produtos naturais, mostrando que essa fonte é muito importante nos estudos de desenvolvimento de novos medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de importância atual tem-se o ácido acetil-salicílico, princípio ativo da Aspirina® isolado inicialmente de uma Salicaceae; a escopolamina, alcaloide isolado de uma Solanaceae e modificado constituindo o princípio ativo do Buscopan®, medicamento analgésico indicado para dores, cólicas e desconfortos abdominais (FELIU, 2011). Pode-se, ainda, mencionar o diterpeno anticancerígeno Taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que após sua síntese em escala industrial, foi disponibilizado no mercado farmacêutico para o tratamento de câncer em ovários e pulmões (AGARWAL et al., 2019).

Inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas na expectativa de se descobrir novos fármacos e medicamentos, principalmente a partir de plantas ditas “medicinais” que possam ser empregadas no tratamento de diferentes tipos de doenças (ATANASOV et al., 2015; SAWADOGO et al., 2012).

O direcionamento dos estudos científicos se sustenta, devido ao fato de que nos últimos anos dentro das especialidades farmacêuticas disponíveis no comércio mundial, aproximadamente 50% são oriundas, direta ou indiretamente de produtos vegetais (PATRIDGE et al., 2016). Os produtos naturais, muitas vezes, possuem princípios ativos que apresentam grupos farmacofóricos ativos frente aos diversos alvos farmacológicos existentes no organismo humano e capazes de atuar sobre os mais diversos tipos de doenças (LI; LOU, 2018; RAO et al., 2016).

Entre as diferentes atividades biológicas de produtos vegetais naturais publicadas, a anti-inflamatória é um dos efeitos mais relatados, e, entre os metabólitos secundários que atuam nos diferentes alvos envolvidos na via inflamatória, os flavonoides, polifenólicos, proantocianidinas, alcaloides, terpenoides e compostos esteroides presentes nos extratos vegetais são geralmente responsáveis por essa atividade (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016; RIBEIRO et al., 2018).

Além disso, os produtos fitoterápicos têm sido bastante utilizados como alternativa terapêutica pela população nos seus cuidados primários com a saúde. Esse aumento significativo da demanda de fitoterápicos que se observa em todo mundo é justificado, por exemplo, pela comprovação científica de sua eficácia, pela procura por boa parte da população por meios naturais de cuidar da saúde e pelo alto custo dos medicamentos convencionais (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2019).

Apesar disso, o potencial de uso sustentável da biodiversidade brasileira para produção de fitoterápicos ainda é pouco explorado comercialmente. Poucos exemplos de agentes fitoterápicos inovadores estão disponíveis no mercado, como Acheflan®, Syntocalmy® e

Melagrião®, produzidos por extratos de plantas padronizados, com comprovação científica de segurança, eficácia e qualidade. Destes, apenas Acheflan® e Melagrião® são obtidos de plantas nativas brasileiras, com indicações para o tratamento de processos inflamatórios e de doenças do trato respiratório, respectivamente (CALIXTO, 2019).

3.6 *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS F.

O gênero *Euphorbia* é composto por 1836 espécies que apresentam como características comuns a presença de látex leitoso e inflorescências especializadas (ERNST et al., 2015). As plantas deste gênero apresentam uma grande diversidade química de seus constituintes isoprenoides. Os diterpenoides são a maioria no gênero com muitas estruturas nucleares diferentes, como jatrofanos, latiranos, tiglianos, ingenanos, além dos triterpenoides, sesquiterpenoides, glicerol, flavonoides e esteroides que também já foram identificados nestas espécies (SHI; SU; KIYOTA, 2008). Além disso, os diterpenos encontrados no látex de espécies de *Euphorbia* têm sido usados como marcadores quimiotaxonômicos, dada sua baixa ocorrência em plantas de outros gêneros e ampla diversidade estrutural (VASAS; HOHMANN, 2014).

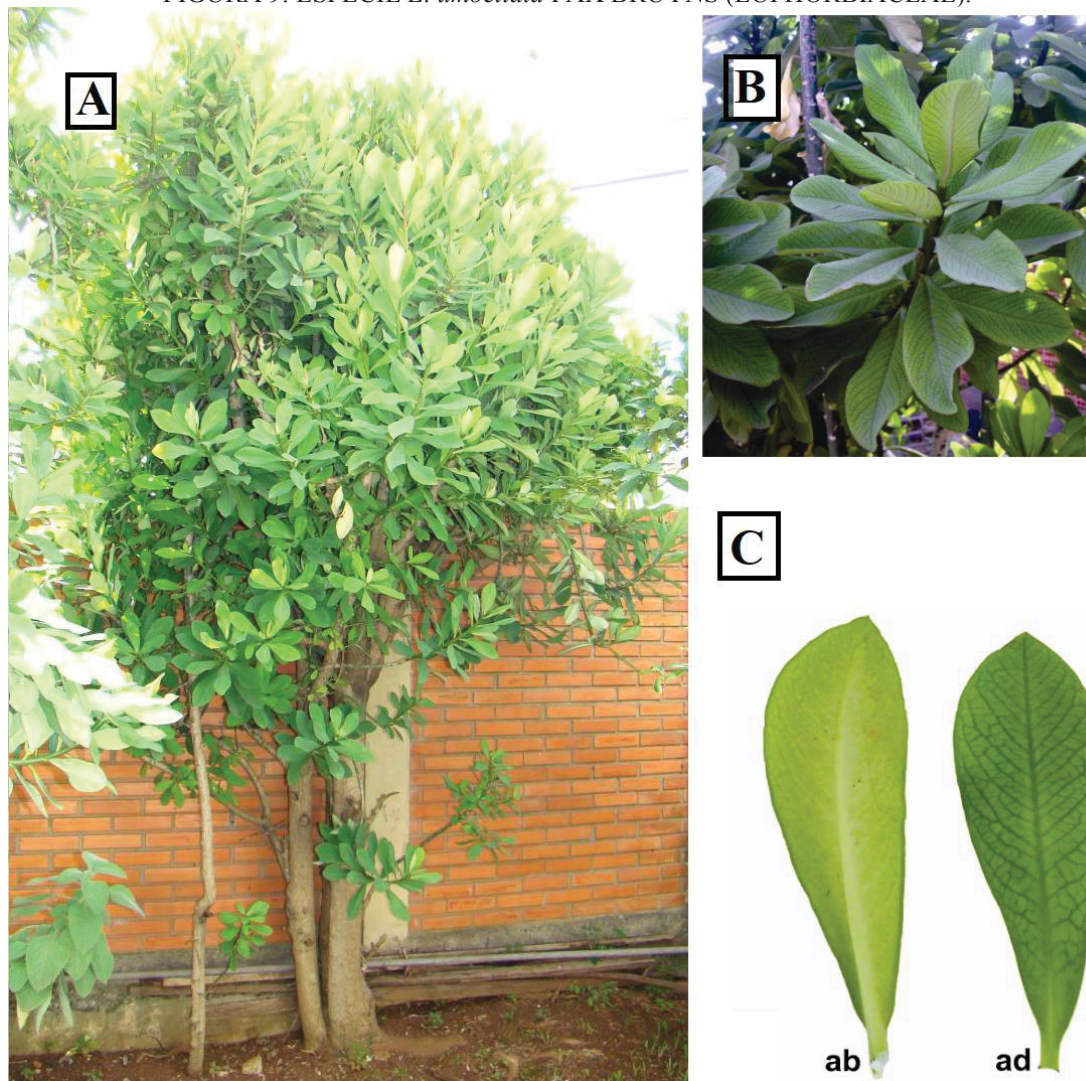
Os extratos e compostos isolados do gênero *Euphorbia* desempenham muitas atividades diferentes, incluindo antiproliferativa, citotóxica, antimicrobiana, anti-inflamatória, entre outras (DUTRA et al., 2016; SHI; SU; KIYOTA, 2008; WACZUK et al., 2012; YANG et al., 2013; ZHANG et al., 2019).

O interesse por espécies de *Euphorbia* iniciou com a descrição da atividade antitumoral de um diterpeno isolado de *Euphorbia esula* Linnaeus em 1976. Mais recentemente, a liberação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária de mubutato de ingenol (Picato®), um diterpeno isolado de *Euphorbia peplus* Linnaeus, para o tratamento tópico da queratose actínica, estimulou ainda mais o interesse por esse gênero (ERNST et al., 2015).

A espécie *E. umbellata* (Pax) Bruyns, também conhecida de *Synadenium grantii* Hook f. ou *Synadenium umbellatum* Pax (LUZ et al., 2015), é popularmente chamada de janaúba ou leitossinha e vem sendo usada pela medicina popular há muitos anos. Seu uso é tradicional entre a população, que utiliza a “garrafada”, obtida através de diluição do látex da planta em água pura e fresca – 18 gotas do látex em 1 litro de água, administrada 3 vezes ao dia via oral (ORTENCIO, 1997). Suas aplicações foram bastante difundidas para o tratamento de variados tipos de cânceres, mas há relatos da utilização da planta para outras enfermidades, tais como inflamações e úlceras (COSTA et al., 2012).

É uma planta arbustiva podendo atingir 3 a 5 metros de altura, nativa da África, mas pode ser encontrada em países como o Brasil e a Índia onde foi introduzida inicialmente como planta ornamental (FIGURA 9) (BAGAVATHI; SORG; HECKER, 1998).

FIGURA 9: ESPÉCIE *E. umbellata* PAX BRUYNS (EUPHORBIACEAE).



NOTA: A - *E. umbellata* no habitat. B – Aspecto dos órgãos vegetativos aéreos. C – Aspecto geral da folha. ab – abaxial, ad – adaxial.

FONTE: Adaptado de Luz et al., 2015

Esta espécie apresenta em sua composição química glicosídeos cianogênicos que são potencialmente tóxicos a muitos organismos vivos, demonstrando o risco da administração de extratos desta planta (BADGUJAR, 2014). No entanto, também apresenta outros compostos químicos interessantes com possível ação farmacológica, entre eles terpenos, flavonoides, alcaloides, entre outros (ANDERSEN et al., 2010; CAMPOS et al., 2016a; COSTA et al., 2012; MINOZZO et al., 2016). As substâncias químicas identificadas na espécie, segundo a literatura, estão apresentadas no QUADRO 1.

QUADRO 1: SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS ISOLADAS NA ESPÉCIE *E. umbellata* DESCRITAS NA LITERATURA.

Parte da planta	Extrato	Metabolitos/Substâncias isoladas	Referência
Látex	Hexano	Terpeno e esteroide (Eufol, Citrostadienol)	Oliveira et al., 2014
		Terpenos e fitoesteróis (eufol e germanicol)	Luz et al., 2016
	Acetona	Terpenos (eufol, tirucalol, euforbol), n-Alcanos, Ácidos graxos, Ácidos aromáticos (ácido benzóico, ácido fenilacético)	Uzbekiliho et al., 1987
	Etanol – sub fração clorofórmio	Terpenos (12-O-tigloil-4-deoxiforbol-13-isobutirato; forbol-12,13,20-triacetato; 12-deoxiforbol-13-(2-metilpropionato); 3,4,12,13-tetraacetilforbol-20-fenilacetato; 4-deoxiforbol-2,13-ditiglate)	Valadão et al., 2018
	Água	Glicoproteínas	Rajesh et al., 2006
Folhas	Clorofórmio	Terpenos (eufol, germanicol, 3,4,12,13-tetraacetilforbol-20-fenilacetato; 4-deoxiforbol-12,13-ditiglate)	Hassan et al., 2012
Folhas e caule	Metanol – sub fração clorofórmio	Terpenos (3,4,12,13-tetraacetilforbol-20-fenilacetato)	Campos et al., 2016
Casca	Etanol/água – sub fração metanol	Compostos polifenólicos	Minozzo et al., 2016
	Etanol/água – sub fração clorofórmio	Terpenos e esteroide (eufol, sitosterol, lanosterol, lupeol, cicloartenol, fridolina, 3 β friedelinol)	Kanunfre et al., 2017
	Etanol/água – sub fração clorofórmio	Terpenos (eufol, lanosterol, 3 β friedelinol, friedelina)	Munhoz et al., 2014

FONTE: A autora, 2019.

Apesar da escassa literatura acerca da constituição química de *E. umbellata*, percebe-se que os metabólitos mais frequentemente identificada são os terpenos, entre os quais o eufol aparece de forma recorrente nos diversos extratos obtidos da planta.

Quanto as atividades biológicas atribuídas a espécie, os principais relatos na literatura são de atividade antiúlcera, anti-inflamatória e citotóxica (CAMPOS et al., 2016a; DE OLIVEIRA et al., 2013; MINOZZO et al., 2016; MUNHOZ et al., 2014).

Estudos realizados com o látex da planta mostraram efeito de proteção gástrica em modelos de indução de lesão por etanol e indometacina em ratos (COSTA et al., 2012), além disso o látex desta espécie também apresentou atividade antitumoral *in vitro* contra células da linhagem B16F10 (melanoma murino), HeLa (colo de útero) e HRT18 (adenocarcinoma colorretal) e *in vivo* no tratamento de melanoma induzido no dorso de camundongos (DE OLIVEIRA et al., 2013; LUZ et al., 2016).

Luz et al. (2016) em um estudo biomonitorado das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica do látex frente às linhagens HRT18 (adenocarcinoma colorretal), células HeLa e células Jurkat (células leucêmicas), demonstrou que todas as frações apresentaram citotoxicidade concentração e dose dependentes, e, também, que a fração hexânica foi a que apresentou maior toxicidade.

O extrato etanólico das folhas de *E. umbellata* apresentou atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (BORGES et al., 2013) e o extrato metanólico da casca atividades antiúlcera e também anti-inflamatória (MINOZZO et al., 2016; MUNHOZ et al., 2014). As atividades biológicas descritas na literatura para as diferentes partes da planta estão apresentadas no QUADRO 2.

QUADRO 2: ATIVIDADES BIOLÓGICAS DESCRITAS NA LITERATURA PARA *E. umbellata*

Parte da planta	Extrato ou substância isolada	Atividade biológica	Referência
Casca	Extrato metanólico	Antioxidante	Munhoz et al., 2014
	Extrato metanólico	Anti-inflamatória	Munhoz et al., 2014
	Extrato hidroalcoólico	Antiúlcera	Minozzo et al., 2016
	Extrato clorofórmico	Citotóxica	Kanunfre et al., 2017
Látex	Puro e extrato aquoso	Antiúlcera	Costa et al., 2012;
	Proteases	Hemostática	Rajesh et al., 2007; Badgujar, 2014
	Proteases	Nematicida	Gomes et al., 2018
	Extrato etanólico	Antiviral	Valadão et al., 2018
	Extrato aquoso	Moluscicida	Pereira et al., 2017
	Extrato hexânico, clorofórmico, acetato de etila, metanólico e aquoso	Citotóxica	Luz et al., 2016; Oliveira et al., 2013; Melo-Reis et al., 2011;
	Extrato aquoso	Antitumoral	Oliveira et al., 2013; Melo-Reis et al., 2010;
Caule e folhas	Extrato metanólico	Analgésico	Jesuino et al., 2019
	Extrato metanólico e Forbol	Antiproliferativo	Campos et al., 2016
	Extrato etanólico	Moluscicida	Hartmann et al., 2011;
Folhas	Extrato etanólico	Antinociceptivo	Borges et al., 2013
	Extrato etanólico	Anti-inflamatória	Borges et al., 2013
	Extrato etanólico	Antitumoral	Nogueira et al., 2008;
	Extrato etanólico	Citotóxica	Mota, Benfica, Valadares, 2012;

FONTE: A autora, 2019.

É possível observar que as atividades de *E. umbellata* que mais se destacam são referentes as atividades anti-inflamatória, citotóxica e antitumoral, visto que, promissores resultados foram observados.

Quanto a toxicidade, Cunha et al. (2009), utilizando modelo *in vivo* com ratas Wistar, mostraram que o extrato etanólico do látex possui baixa toxicidade aguda, enquadrando a espécie como classe 5 (substância com DL 50 superior a 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg),

no entanto o látex puro provocou alterações histopatológicas no fígado, rins e pulmões dos animais (CUNHA et al., 2009).

Da mesma forma, Costa et al. (2012) observaram alta toxicidade do látex puro em modelos *in vivo* com o microcrustáceo *Artemia salina*, sendo o efeito dose dependente. Os mesmos autores, avaliaram ainda, a toxicidade oral do látex puro e diluído em modelo *in vivo* com ratas e não observaram alterações macroscópicas significativas nos órgãos. Em relação aos parâmetros bioquímicos também não houve diferença estatística, porém o látex puro apresentou valores maiores de enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase) do que a diluição.

3.7 EUFOL

O triterpeno tetracíclico eufol é largamente descrito como constituinte majoritário em espécies de plantas da família Euphorbiaceae (DUTRA et al., 2012a; MATA et al., 2011; PENG et al., 2012; TSOPMO; KAMNAING, 2011; YASUKAWA et al., 2000).

São atribuídas a esta substância importantes atividades biológicas como antinociceptiva e anti-inflamatória, na qual foi eficaz na redução de doenças intestinais, doenças autoimunes do sistema nervoso central e na redução da dor quando administrado oralmente em ratos (DUTRA et al., 2011, 2012a, 2015). Os mecanismos propostos para tal atividade foram a inibição de mediadores inflamatórios modulados por PKC ϵ (proteína C quinase epsilon), como TNF- α , óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) e interação com receptores canabinoides além de inibir a resposta imune mediada por células T (DUTRA et al., 2012b, 2012a, 2015; PASSOS et al., 2013).

Ainda seguindo essa linha de atividade biológica, Mata et al. (2011) demonstraram atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* e Yusukawa et al. (2000) demonstraram além de atividade anti-inflamatória em modelos de indução de inflamação com 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato em pele de ratos, atividade antitumoral aplicando o eufol topicamente nos animais (MATA et al., 2011).

Outra atividade bastante relatada do eufol são os efeitos citotóxicos em culturas de células tumorais, Lin et al. (2012) avaliando esta substância em cultura de células de tumores gástricos, demonstraram que o eufol apresenta efeitos antiproliferativos e promove seletivamente a apoptose nas células gástricas cancerosas. Eles ainda afirmam que o eufol é um agente potencialmente promissor no auxílio da quimioterapia contra o câncer gástrico em

humanos e que a especificidade de direcionamento do eufol para células cancerosas podem conduzir à redução dos efeitos secundários tóxicos em pacientes com câncer.

Além destes autores, estudo recente em um painel de 73 linhagens celulares de câncer humano de 15 tipos de tumores mostrou efeitos citotóxicos do eufol em todas as linhagens celulares, com mais da metade considerada altamente sensível e exibiu interações sinérgicas do eufol com gencitabina e paclitaxel em linhagens de células pancreáticas e esofágicas, respectivamente (SILVA et al., 2018).

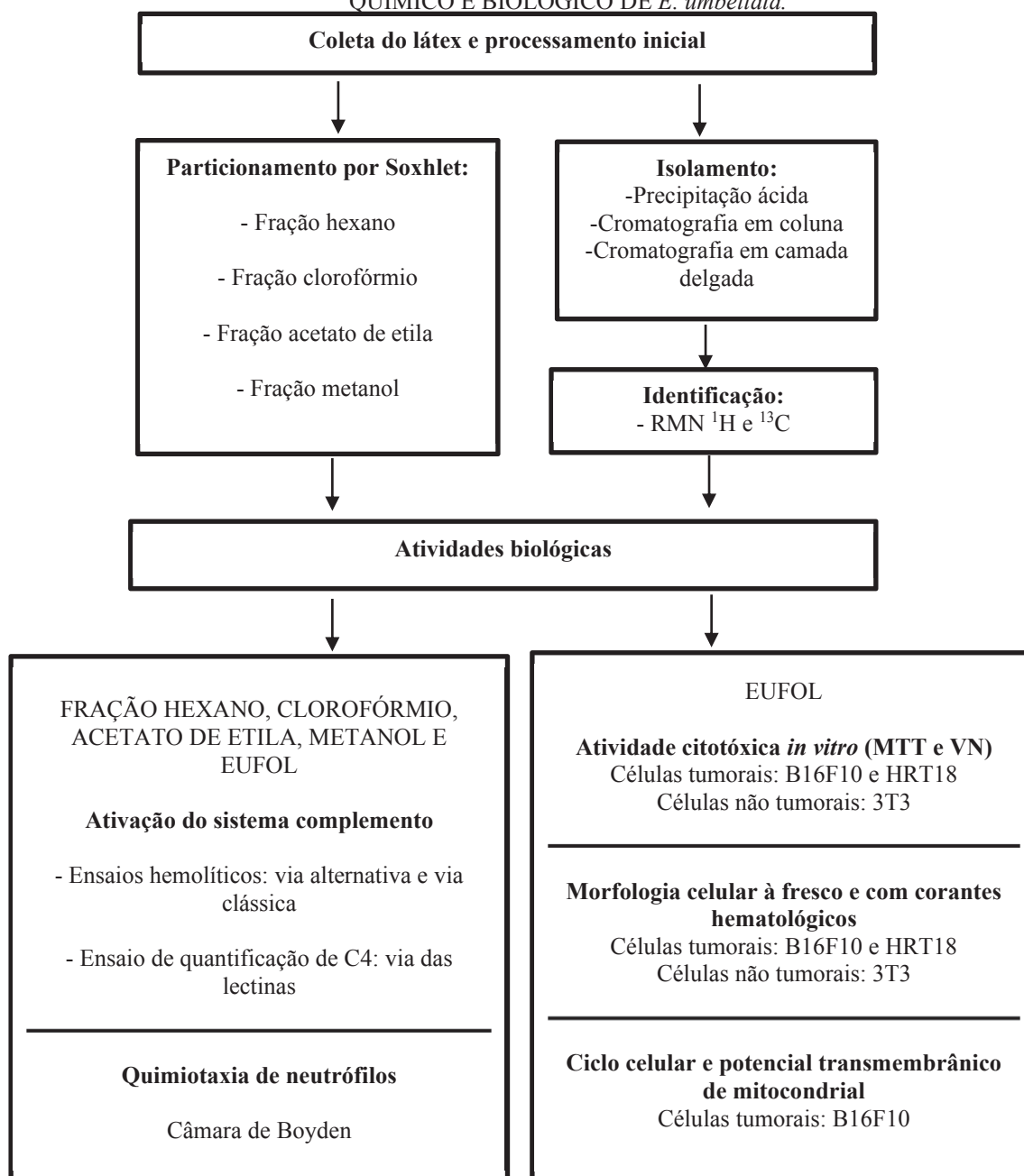
Os mecanismos propostos para esta atividade podem estar relacionados com a capacidade do eufol de direcionar o ciclo celular, reduzindo os níveis de ciclina D1, A e B1, regulando negativamente a CDK2 (ciclina dependente de quinase 2) e provocando indução de inibidores de ciclina dependentes de quinase (CKI) p21 e p27 que são proteínas reguladoras do ciclo celular (WANG et al., 2013).

Além disso, estudos relacionam a morte celular induzida pelo eufol à autofagia quando testado em cultura de células de glioma (SILVA et al., 2019). Alguns autores atribuem ao eufol a capacidade de diminuir a sinalização do fator de transformação do crescimento beta (TGF β), que, na fase de crescimento tumoral apresenta efeitos promotores e levam à migração, invasão e metástase tumoral (CHEN et al., 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos realizados foram didaticamente divididos em etapas, conforme demonstrado no fluxograma abaixo (FIGURA 10).

FIGURA 10: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ADOTADO NA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *E. umbellata*.



FONTE: A autora, 2019.

4.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DA PLANTA

A coleta do material vegetal para identificação (montagem da exsicata) foi realizada na região da Ponta Grossa em agosto de 2013 (altitude: 975 metros, latitude: 25° 05'38''S, longitude: 50° 09'30'' O) Paraná, Brasil. A exsicata foi identificada pela taxonomista especialista em Euphorbiaceae Prof. Dra. Inês Cordeiro em fevereiro de 2014, depositada e registrada no Herbário Maria Eneida P. Kauffmann Fidalgo, do Instituto de Botânica de São Paulo, sob número de registro SP453920.

Foram coletados aproximadamente 60 g de látex, por meio de inserções longitudinais no caule e galhos da planta após limpeza do tronco usando álcool 70% com esponja. Este material foi armazenado em geladeira até o momento do uso (FIGURA 11).

FIGURA 11: COLETA DO LÁTEX DE *E. umbellata*



FONTE: A autora, 2019.

4.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO

4.2.1 Obtenção das frações

O látex *in natura* (40,38g) foi fracionado utilizando um extrator de Soxhlet (capacidade de 250 mL) com solventes de polaridade crescente. Para tanto o látex foi adsorvido em quantidade suficiente de sílica 35-70 mesh (aproximadamente 28 g) e deixado em refluxo com cada um dos solventes por 5 horas, sendo na sequência, o solvente com o extrativo retirado e substituído por um de maior polaridade, segundo a sequência: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol (LabSynth, BR). As quatro frações foram concentradas em evaporador rotativo

sob pressão reduzida a 40 °C até a completa evaporação do solvente. Estas foram mantidas sob refrigeração até o momento do uso.

4.2.2 Isolamento Eufol

O látex *in natura* (19,52 g) foi submetido a um processo de precipitação ácida. O procedimento consiste na adição do látex em 100 mL água acidificada (1% ácido sulfúrico), seguido da adição de 100 mL de éter de petróleo sob agitação e filtração do precipitado formado. Este foi armazenado sob refrigeração até momento do uso. Parte do precipitado (2,98 g) foi aplicada a uma cromatografia em coluna (CC) eluída de modo gradiente utilizando hexano e acetato de etila (TABELA 1) e resultando em 666 frações que foram estudadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como revelador a vanilina sulfúrica (CRUZ, 2017).

TABELA 1: DESCRIÇÃO DO GRADIENTE DE ELUIÇÃO DA FASE MÓVEL DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Fase móvel	Gradiente	Volume (L)	Frações
Hexano: acetato de etila	95:5	3	1 – 117
Hexano: acetato de etila	92,5:7,5	2	118 – 203
Hexano: acetato de etila	90:10	2	204 – 297
Hexano: acetato de etila	85:15	2	298 – 378
Hexano: acetato de etila	75:25	2	379 – 454
Hexano: acetato de etila	65:35	1	455 – 544
Hexano: acetato de etila	50:50	1,8	545 – 666

FONTE: A autora, 2019

As frações semelhantes, conforme o fator de retenção (R_f), foram agrupadas. A fração 244-254 (Hex:Acetato, 9:1) apresentou cristais esbranquiçados e em forma de agulha (FIGURA 12), foi submetida a análises espectroscópicas e a identificação realizada a partir de comparação com a literatura.

4.2.2 Dados espectroscópicos da identificação de substâncias isoladas

A análise espectroscópica se deu em espectrômetro Bruker AVANCE III HD 600 e Bruker AVANCE III 400 no Centro Nacional de Pesquisas em Produtos Naturais da Universidade do Mississippi. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado para obtenção de espectros de ^1H e ^{13}C , e como referência interna, o próprio solvente e TMS. Os resultados foram comparados com a literatura.

4.3 ENSAIOS *in vitro* AVALIANDO A ATIVIDADE DO SISTEMA COMPLEMENTO (SC)

4.3.1 Obtenção de soro humano

As análises de atividade do SC foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínica de Curitiba e, um *pool* de sangue humano do tipo O negativo, foi utilizado como fonte dos componentes do SC, conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Paraná (nº 1.703.531). O sangue total (50 mL) foi obtido de doadores voluntários saudáveis e, em seguida, foi armazenado sob refrigeração (2-8 °C) até coagulação total e centrifugado por 20 min, a 3500 g e 12 °C. Após preparação do *pool* das amostras, o soro humano normal (SHN) foi separado em alíquotas de 500 µL em microtubos plásticos e mantidos congelados à -80 °C, até sua utilização.

4.3.2 Preparo das soluções-teste utilizadas nos testes de fixação do complemento

As frações do látex de *E. umbellata* e o eufol foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO 20%) e então em tampão HEPES 10 mM, NaCl 150 mM na concentração de 5 mg/mL (1955 µM para o eufol) e, a partir dessa solução, foram realizadas as diluições em série (fator 2) das amostras, originando as demais concentrações a serem testadas nos experimentos: 416,5; 208,3; 104,1; 52,1; 26,0; 13,0 e 6,5 µg/mL (correspondente a 977,5; 488,7; 244,3; 122,1; 61,1; 30,5 e 15,3 µM para o eufol). Heparina suína (5.000 UI/mL) foi utilizada como controle positivo de inibição do SC.

4.3.3 Ensaios hemolíticos de fixação do SC

A atividade da VC e VA do SC foi analisada através do teste hemolítico de fixação de complemento e os resultados obtidos foram expressos em relação à percentagem de hemólise (MORENO-INDIAS et al., 2012; ROOS et al., 2001).

4.3.3.1 Preparo das suspensões de eritrócitos de carneiro

Para avaliação da hemólise promovida pela VC foi utilizado sangue de carneiro (Kalifarma, BRA) armazenados em solução anticoagulante EDTA.Na₂. Para o preparo da suspensão de eritrócitos da VC, 5mL do sangue de carneiro foram centrifugados por 5 minutos

a 1440 g e a papa de hemácias obtida foi submetida a três lavagens seguidas com solução de NaCl 0,9% (m/v) e uma vez com tampão HEPES com Mg^{+2} e Ca^{+2} (HEPES 10mM, NaCl 150mM, $CaCl_2$ 0,11 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, pH 7,4). Após a última centrifugação, os eritrócitos foram ressuspensos com o tampão HEPES suplementado com Mg^{+2} e Ca^{+2} , obtendo a concentração de 2,4%. Para sensibilização dos eritrócitos de carneiro foi adicionado volume igual de hemolisina (soro de coelho anti-hemácia de carneiro) (Laborclin, Curitiba, PR, Brasil) na concentração 1:4000 e o material foi incubado por 30 minutos a 37°C. No final da sensibilização, a suspensão de eritrócitos de carneiro na concentração de 1,2% foi utilizada para avaliação da VC.

4.3.3.2 Preparo das suspensões de eritrócitos de coelho

Para a avaliação da hemólise promovida pela VA foi utilizado sangue de coelho (Kalifarma, BRA) armazenados em solução anticoagulante EDTA.Na₂. Para a avaliação da VA, 5 mL de sangue de coelho foram centrifugados por 5 minutos a 1440 g. Os eritrócitos foram então recolhidos e lavados três vezes com solução de NaCl 0,9% (m/v) e um vez com o tampão HEPES/EGTA com Mg^{+2} (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 7 mM, EGTA 10 mM, pH 7,4). Após a última centrifugação, os eritrócitos foram ressuspensos no tampão HEPES/EGTA com Mg^{+2} , obtendo-se uma suspensão de eritrócitos na concentração final de 2,4 % (v/v) que foi posteriormente utilizada para avaliação da VA.

4.3.3.3 Titulação do Soro humano normal (SHN)

Foi realizada uma curva de titulação para determinação do título de SHN (quantidade de SHN necessária para provocar 50% de hemólise dos eritrócitos de carneiro ou coelho) a ser utilizado nos ensaios.

Para isso, alíquotas de 50 µL de SHN diluídas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:50, 1:67, 1:89, 1:119, 1:158, 1:211, 1:281) em tampão HEPES com Mg^{2+} e Ca^{2+} foram adicionadas a 50 µL de suspensão de eritrócitos de carneiro 1,2% previamente sensibilizada com hemolisina para a VC.

Para a VA foi utilizado alíquotas de 50 µL de SHN diluídas (1:2, 1:4, 1:8, 1:10, 1:12, 1:16, 1:32, 1:64, 1:100 e 1:200) em tampão HEPES/EGTA com Mg^{2+} e 50 µL de suspensão de eritrócitos de coelho 2,4% com tampão. Acrescentou-se ainda a cada amostra, 20 µL do tampão correspondente a cada via.

Os tubos foram então incubados por 30 minutos a 37°C e submergidas em gelo, logo em seguida a centrifugação foi realizada por 5 minutos a 1440 g. Findo esse processo, 100 µL do sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços de fundo chato (Techno Plastic products AG®, SWI) e a leitura foi realizada a 405 nm em espectrofotômetro de microplacas (Bio Tek, EUA). O experimento foi realizado em triplicata.

Foram utilizados como controles SHN+hemácias (carneiro ou coelho) correspondendo a 100% de hemólise e hemácias+tampão (correspondente de cada via, VC e VA) como 0% de lise ou branco. A partir dos valores da leitura de absorbância (Abs), as porcentagens de hemólise (X) foram calculadas utilizando a seguinte fórmula:

$$X = \left[\frac{Abs \text{ soro} - Abs \text{ branco}}{Abs \text{ 100\%lise} - Abs \text{ branco}} \right] \times 100\%$$

O cálculo para os valores de CH50 e AP 50 foram feitos a partir da curva de titulação construída com o percentual de hemólise obtido em cada título do SHN.

4.3.3.4 Ensaios para avaliação da VC e VA

Para a realização do ensaio avaliação da VC e VA, adicionou-se 50 µL de suspensão de eritrócitos (carneiro sensibilizado ou coelho) a 20 µL de amostra (frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol do látex de *E. umbellata* e eufol) e 50 µL de SHN (1:55 VC e 1:9 VA). Este material foi incubado por 30 minutos a 37°C. As amostras foram então retiradas da estufa e submergidas em gelo, para a garantia de parada total da ação do complemento. Em seguida, essas foram centrifugadas (1440 g, 5 minutos) e os sobrenadantes transferidos para placa com 96 poços. A absorbância a 405 nm foi medida utilizando um leitor de microplacas. Foram utilizados os mesmos controles descritos no item anterior acrescido de um controle de cor de cada extrato, composto por tampão+extrato. Todos os extratos foram testados previamente quanto à atividade hemolítica nas mesmas concentrações aplicadas em todos os experimentos, nenhum deles apresentou hemólise detectável, sendo considerado não hemolítico. As porcentagens de hemólise (X) foram calculadas utilizando a fórmula:

$$X = \left[\frac{Abs \text{ soro} - Abs \text{ branco}}{Abs \text{ 100\%lise} - Abs \text{ branco}} \right] \times 100\%$$

4.3.4 Ensaio de ativação da Via das Lectinas

A via da lectina foi ativada na presença de manana e quantificada por ELISA (ROOS, WIESLANDER, 2014). Para isso, uma placa de 96 poços foi sensibilizada com 1µg/poço de manana diluída em tampão carbonato (pH 9,5, NaHCO₃ 0,1 M, Na₂CO₃ 0,1 M) no volume final de 100 µl/poço e incubada por 16h em temperatura ambiente. Após a lavagem, a placa foi bloqueada com 100µl de albumina de soro bovino 1% (BSA) em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) incubados por 1 hora a 37°C. Todo o material em excesso foi então removido.

Para a curva padrão, as placas foram incubadas durante 1hora a 37°C com 100µl SHN em diferentes diluições em tampão HEPES para VL (1:50, 1:67, 1:89, 1:119, 1:158, 1:211, 1:281) utilizado como curva padrão. Cada diluição de SHN corresponde a 1000, 750, 563, 422, 316, 237 e 178 mUA/mL, respectivamente. Para as amostras 100µl de cada titulação (eufol e extratos nas concentrações citadas no item 4.3.2) e do SHN (1:100) foram adicionadas e a placa também foi incubada nas mesmas condições e tempo. Após a lavagem, 100 µl/poço de anticorpo anti-C4 humano (policlonal de cabra, ATB, USA) diluído 1:5000 (PBS; Tween a 0,05%; BSA a 1%) foi adicionado e incubado por 1hora a 37°C. A placa foi lavada novamente e 100 µl/poço de anticorpo secundário IgG de cabra de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, USA) diluído 1:30000 (PBS, Tween a 0,05%, BSA a 1%) e incubado por mais 1 hora a 37°C. Após esse tempo, os poços foram lavados e adicionou-se 1mg/mL de substrato *p*-nitrofenil fosfato dissódico (PNPP, Sigma, EUA) diluído em tampão dietanolamina 1M suplementado com 0,5 mM MgCl₂ (pH 9,8) foi aplicado e a placa foi incubada por mais 15 minutos a 37°C. A absorbância foi lida a 405 nm. A absorbância obtida a partir das leituras de padrões de concentrações conhecidas é proporcional às unidades arbitrárias (mUA/mL) utilizadas para a curva padrão.

4.4 QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS

4.4.1 Preparo das soluções-teste para o ensaio de quimiotaxia de neutrófilos

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados no laboratório de Hematologia da Universidade Federal do Paraná e, para tanto, as frações do látex de *E. umbellata* e o eufol foram solubilizados em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma, USA) com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (Vitrocell, BR) na concentração de 125,0 µg/mL (293,4 µM para o eufol). A partir dessa solução, foram realizadas as diluições em série (fator 2) das

amostras, originando as demais concentrações a serem testadas nos experimentos: 62,5; 31,2 e 15,6 $\mu\text{g/ml}$ (correspondente a 146,7; 73,4 e 36,7 μM para o eufol).

4.4.2 Preparo da solução de caseína a 5% (p/v)

A caseína em pó foi dissolvida em PBS (50mg/ml) e aquecida a 56 °C por 10 minutos. A solução foi resfriada rapidamente a 4°C e centrifugada a 1300 g por 5 minutos para remoção de partículas insolúveis. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a -20°C. No momento do uso, a alíquota descongelada foi diluída 5x em PBS suplementado (BSA 0,25%, glicose 0,1%, CaCl_2 0,9 mM e MgCl_2 0,5 mM).

4.4.3 Obtenção dos neutrófilos humanos

Dez a vinte mililitros de sangue periférico de voluntários sadios colhidos com EDTA foram usados como fonte de neutrófilos humanos. O sangue anticoagulado foi centrifugado por 10 minutos a 200 g e o sobrenadante (plasma rico em plaquetas) foi descartado. O volume inicial de sangue total foi reconstituído com PBS e centrifugado novamente por 15 minutos a 400 g. A porção intermediária, rica em leucócitos, foi transferida para um tubo cônico contendo 8 mL de PBS e homogeneizada. A suspensão de células (leucócitos e hemácias) foi então transferida para tubo cônico contendo 3 mL de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, USA) e centrifugada por 25 minutos a 400 g (sem parada forçada da centrífuga). A camada superior (mononucleares) foi desprezada e a camada inferior (granulócitos e hemácias) foi transferida para tubo cônico contendo 50ml de solução lisante (cloreto de amônia 150 mM, bicarbonato de sódio 10 mM e EDTA dissódico dihidratado 0,1 mM, pH 7,4), para lisar as hemácias remanescentes, e deixado em agitação por 10 minutos. Após esse período, a suspensão de células foi submetida a centrifugação por 5 minutos a 800 g e o sobrenadante desprezado. Os leucócitos foram submetidos à lavagem com PBS, seguida da sua ressuspensão em PBS suplementado (BSA 0,25%, glicose 0,1%, CaCl_2 0,9 mM e MgCl_2 0,5 mM). Após contagem em câmara de Neubauer a suspensão celular foi ajustada para 10^6 células/mL.

Os leucócitos foram incubados por 30 minutos em estufa a 37°C com as diferentes concentrações das frações e do eufol (item 4.4.1), em seguida foram lavados e ressuspensos em meio RPMI 1640 suplementado para o ensaio de quimiotaxia. O teste de viabilidade celular foi realizado usando azul de tripano para determinar a toxicidade dos compostos nos neutrófilos nas diferentes concentrações testadas.

4.4.4 Migração leucocitária *in vitro*

A locomoção dos leucócitos em direção à caseína (quimiotaxia positiva) foi observada em Câmaras de Boyden. Para isto, 200 µl de caseína foram adicionadas ao compartimento inferior das câmaras. Filtros de policarbonato isentos de polivinilpirrolidona (Neuroprobe, USA), com poros de 5 nm de diâmetro, foram usados para separar os compartimentos superior e inferior. Os compartimentos superiores foram preenchidos com 200 µl de suspensão de leucócitos a $10^6/\text{mL}$ (previamente incubada com as amostras testes). As câmaras foram, então, incubadas a 37°C por 90 minutos e o número de leucócitos que migraram ativamente para o compartimento inferior foram transferidos e contados com o auxílio de um hemocítômetro. Como controle negativo de migração dos neutrófilos foi utilizado PBS suplementado adicionado no compartimento inferior da câmara.

4.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E MORTE CELULAR

4.5.1 Cultura de células

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no laboratório de Biologia celular da Universidade Estadual de Ponta Grossa e, para tanto, foram utilizadas células aderidas de carcinoma colorretal humano (HRT18), melanoma murino (B16F10) e fibroblastos (3T3), adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BC-RJ) e mantidas em cultura no laboratório, através de expansão contínua em 15 mL de meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e 100 µL de penicilina em estufa a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. As células foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos (BIOENGE® 4004) e ressuspensas em meio RPMI 1640, contadas e a concentração utilizada nos testes foi de aproximadamente 4×10^4 células/mL.

4.5.2 Ensaios de citotoxicidade celular por redução mitocondrial de metil tiazolil tetrazólium (MTT)

As células foram semeadas em placa de 96 poços e as concentrações testadas foram 7,3; 14,6; 29,3; 58,7; 117,4; 176,1; 234,7 µM de eufol solubilizado em DMSO (0,5%). Após incubação de 24, 48 e 72 horas, em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂, adicionou-se o reativo brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, Biotec, BR) a 0,5

mg/mL e a placa foi novamente incubada por mais 4 horas. Em seguida, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante e adicionou-se 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização do precipitado de formazan formado. Agitou-se bem a placa e a absorbância foi medida em leitor de placa de Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) a 560 nm (MOSMANN, 1983). Foi utilizado o solvente DMSO (0,5%) e o próprio meio de cultura RPMI como controles negativos e o experimento realizado em triplicata.

A absorbância obtida das células controle (não tratadas) foi considerado como 100% de viabilidade celular. O percentual de células viáveis de cada concentração foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{Células viáveis} = \frac{\text{Média da Abs de cada concentração}}{\text{Média da Abs do controle}} \times 100$$

4.5.3 Ensaio de citotoxicidade por internalização lisossomal de Vermelho Neutro

A solução de Vermelho Neutro (VN) foi preparada no momento do ensaio para evitar a degradação do corante, e consiste na solubilização de 20mg do corante em pó em 2,5mL de PBS (solução mãe). A partir dessa solução foi preparada a solução de uso, utilizando-se 5 μ L da solução mãe para cada mL de RPMI (sem SFB e antibióticos), obtendo-se uma concentração final de 40 μ g/mL.

As células foram semeadas em placa de 96 poços e foram testadas as concentrações de 7,3; 14,6; 29,3; 58,7; 117,4; 176,1; 234,7 μ M de eufol solubilizado em DMSO (0,5%). Após incubação de 24, 48 e 72 horas, em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂, os poços foram esgotados e lavados com 100 μ L de PBS. Após a lavagem, foram adicionados 200 μ L da solução de uso contendo VN. A placa foi colocada em estufa por 2 horas. Os poços então foram esvaziados e lavados duas vezes com 100 μ L de solução fixadora (formol 10 % em 0,1 M de CaCl₂). Só então o VN internalizado foi solubilizado com 200 μ L de solução eluente (ácido acético 10% + etanol 50%) e a coloração formada lida em espectrofotômetro a 540nm (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). Foi utilizado o solvente DMSO (0,5%) e o próprio meio de cultura RPMI como controles negativos e o experimento realizado em triplicata.

A absorbância obtida das células controle (não tratadas) foi considerado como 100% de viabilidade celular e o percentual de células viáveis para cada concentração foi determinada pela fórmula:

$$\text{Células viáveis} = \frac{\text{Média da Abs de cada concentração}}{\text{Média da Abs do controle}} \times 100$$

4.5.4 Determinação de IC50

A concentração da substância necessária para produzir 50% de redução na viabilidade celular (IC50) foi calculada através dos valores de absorbância, que foram convertidos em porcentagem de inibição e a análise da curva de regressão não-linear usando o GraphPad PRISM versão 5 (GraphPad Software, EUA) foi realizada com base nos resultados de viabilidade.

4.5.5 Índice de seletividade (IS)

Os valores de IS foram calculados no experimento de 72 h, pois apresentaram maior citotoxicidade, através da razão entre IC50 encontrada para uma linha celular normal (3T3) e neoplásica (B16F10 e HRT18):

$$IS = \frac{IC50 \text{ linhagem normal}}{IC50 \text{ linhagem tumoral}}$$

4.5.6 Avaliação morfológica através da microscopia óptica

As células B16F10, HRT18 e 3T3 foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas com eufol nas concentrações de 234,7, 176,1, 58,7, 29,3, 14,6 e 7,3 µM por 72hs. As alterações morfológicas foram observadas sob microscópio óptico com luz invertida (Olympus, GER).

4.5.7 Avaliação morfológica por MayGrunwald e Giemsa

A análise morfológica das linhagens B16F10, HRT18 e 3T3 foi realizada em placas de 24 poços e o plaqueamento foi feito sobre a lamínula circular, com densidade celular de 3×10^3 /poço com 500 µL de meio de cultura RPMI suplementados com 10% de SFB e 1% de penicilina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para estabelecimento celular. Após esse período as células foram tratadas com eufol nas concentrações de 234,7, 176,1, 58,7 e 29,3 µM e incubadas 72 horas.

Após esse tempo, foi retirado o meio de cultura, as células foram lavadas com PBS e em seguida foi adicionado 2% de formol em PBS. Essa solução foi deixada em contato por 10 minutos para fixação do material celular. Na sequência as células foram lavadas novamente com PBS e, sobre elas, adicionado 300 µL do corante MayGrunwald que focaram em contato com as células por 5 minutos para obtenção da coloração desejada. Após, realizou-se lavagem

com água, e adição subsequente do corante Giemsa por 15 minutos. Finalizado o tempo de coloração, foi feita a lavagem com água.

Para a montagem das lâminas, a lamínula circular foi transferida para uma lâmina retangular a qual foi vedada com esmalte e a visualização foi feita em microscópio óptico. Foram utilizados como controles negativos o próprio meio de cultura RPMI e veículo das amostras DMSO 0,5%.

4.5.7 Análise do ciclo celular

Para a análise do ciclo celular por citometria de fluxo, as células B16F10 foram plaqueadas na concentração de 8×10^5 células/poço em meio de cultura RPMI suplementados com 10% de SFB e 1% de penicilina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para estabelecimento celular. Após esse período as células foram tratadas com eufol nas concentrações de 35,2, 17,5, 8,7 µM. Após 24 horas de incubação, foi retirado o meio de cultivo das células, lavado com PBS, colocado sobre as células Tripsina (cerca de 200 µL por poço – placa de 24 poços) e incubados novamente por cerca de 5 minutos para completa liberação das células. Em seguida, a tripsina foi neutralizada com meio RPMI, as células foram então transferidas para microtubos e centrifugadas a 400 g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* de células foi lavado com PBS e centrifugado novamente nas mesmas condições. O *pellet* de células foi então ressuspensão em 200 uL da solução de 1,4 µL de Triton X-100 1%, 20 µL de RNase (20mg/mL), 60 µL de Iodeto de propídio (2 mg/mL) e 9.918 µL PBS. As células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro e foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto™ II) no canal FL2-H. Foi utilizado como controle positivo o quimioterápico doxorrubicina na concentração de 0,46 µM (BRANDÃO et al., 2013). Como controle negativo foi utilizado o solvente DMSO (0,5%) utilizado para solubilização do eufol.

4.5.8 Análise do potencial transmembrânico de mitocôndria (MTP)

As células B16F10 foram plaqueadas na concentração de 8×10^5 células/poço em meio de cultura RPMI suplementados com 10% de SFB e 1% de penicilina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para estabelecimento celular. Após esse período as células foram tratadas com eufol nas concentrações de 93,8 e 34,4 µM (correspondente a 40,0 e 15,0 µg/mL). Após 24 horas de incubação, foi retirado o meio de

cultivo das células, lavado com PBS, colocado sobre as células Tripsina (cerca de 200 μ L por poço – placa de 24 poços) e incubados novamente por cerca de 5 minutos para completa liberação das células. Em seguida, a tripsina foi neutralizada com meio RPMI, as células foram então transferidas para microtubo e centrifugadas a 400 g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pellet de células foi lavado com PBS e centrifugado novamente nas mesmas condições. As células foram então incubadas em solução de rodamina 123 (2,5 μ M) em PBS por 10 minutos a 37°C. As células foram então lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 30 minutos em 500 μ L de PBS à 37°C. Posteriormente, a despolarização de mitocôndria foi avaliada por citometria de fluxo (FACS Calibur).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e analisados pela diferença de significância estatística experimental utilizando análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Os dados foram analisados usando o software GraphPad PRISM versão 5 (GraphPad Software, EUA). O nível de $P \leq 0,05$ será utilizado para determinar a significância estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

5.1.2 Extração e isolamento

A análise fitoquímica é composta pelas etapas de coleta, preparação do material vegetal, extração, fracionamento, isolamento, purificação e pôr fim a elucidação estrutural da substância originada do metabolismo secundário vegetal. Tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença (REGINATTO, 2017).

Em análises fitoquímicas, quando não se conhece previamente o material a ser analisado, costuma-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente, conseguindo-se, assim, uma extração fracionada, em que as diferentes frações contêm compostos de polaridades crescentes (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

As frações do látex de *E. umbellata* que apresentaram maiores rendimentos foram as frações obtidas a partir dos solventes hexano e clorofórmio que apresentaram 24,91% e 11,12% respectivamente, seguidas das frações acetato de etila com rendimento de 2,92% e 0,09% para o metanol.

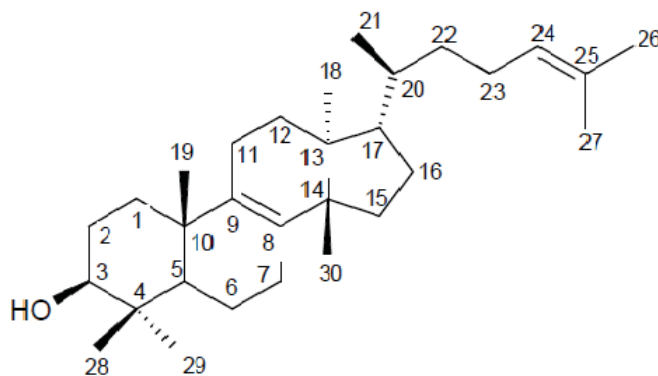
Além do preparo das frações realizou-se também procedimento cromatográfico para o isolamento de substâncias. A fração 244-254 (Hexano:Acetato, 9:1), que apresentou cristais esbranquiçados e em forma de agulha (FIGURA 12), foi submetida a técnicas espectroscópicas e permitiram a elucidação estrutural do triterpeno eufol (FIGURA 13). O processo de isolamento resultou em 0,8 g de eufol com um rendimento de 27% e o grau de pureza $\geq 98,0\%$ determinado por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas.

FIGURA 12: ASPECTO DA FRAÇÃO 244-254 OBTIDA APÓS REUNIÃO DAS FRAÇÕES COM FATOR DE RETENÇÃO SEMELHANTES



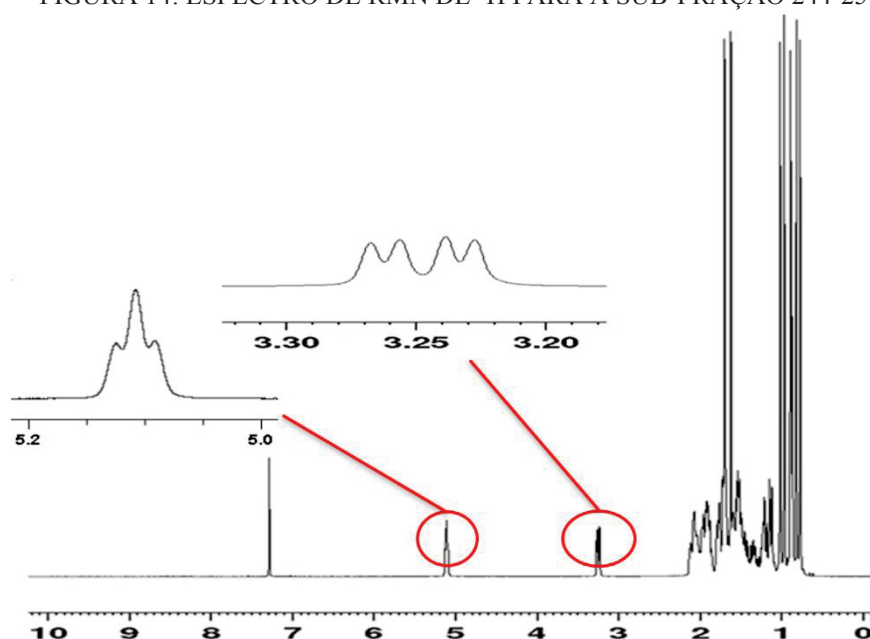
FONTE: A autora, 2019.

FIGURA 13: ESTRUTURA MOLECULAR DO TRITERPENO EUFOL.



FONTE: A autora, 2019

O espectro de RMN ^1H em clorofórmio deuterado (CDCl_3) dos cristais obtidos da fração 244-254 mostrou sinais de duplo dubleto de hidrogênio em δ 3,24 atribuído ao H-3 e em δ 5,10 ppm há um triplo multipeto atribuído ao H-24. Também, é possível observar vários deslocamentos na região de δ 0,7 - 1,7 ppm associados aos hidrogênios das metilas C18, C19, C21, C26, C27, C28, C29 e C30 presentes na estrutura (FIGURA 14). Os demais deslocamentos químicos de hidrogênio e os de carbono estão nas Tabelas 2 e 3, e foram comparados com a literatura permitindo a identificação do triterpene eufol (DUTRA et al., 2012a).

FIGURA 14: ESPECTRO DE RMN DE ^1H PARA A SUB-FRAÇÃO 244-254.

NOTA: Ampliação do sinal com deslocamento 3,24 ppm, demonstrando o duplo duplete ($J = 11,66$ Hz) referente ao H3 e multiplete em 5,10 ppm referente ao H24.

FONTE: A autora, 2019.

TABELA 2: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE HIDROGÊNIO OBSERVADOS PARA O COMPOSTO ISOLADO DO LÁTEX DE *E. umbellata* EM COMPARAÇÃO COM A LITERATURA

Hidrogênio	Literatura δ (ppm)	Experimental δ (ppm)	J (Hz)
H-3	3,23 <i>dd</i>	3,24 <i>dd</i>	4,6 e 11,6
H-18	0,75 <i>s</i>	0,77 <i>s</i>	
H-19	0,95 <i>s</i>	0,96 <i>s</i>	
H-21	0,85 <i>d</i>	0,87 <i>d</i>	6,1
H-24	5,09 <i>m</i>	5,10 <i>tm</i>	
H-26	1,50 <i>s</i>	1,62 <i>s</i>	
H-27	1,68 <i>s</i>	1,69 <i>s</i>	
H-28	1,00 <i>s</i>	1,00 <i>s</i>	
H-29	0,80 <i>s</i>	0,81 <i>s</i>	
H-30	0,87 <i>s</i>	0,89 <i>s</i>	

NOTA: s-singlete, d- duplete, dd- duplo duplete, tm- triplo multiplete. Resultados comparados com DUTRA et al., 2012b).

FONTE: A autora, 2019.

TABELA 3: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE CARBONO OBSERVADOS PARA O COMPOSTO ISOLADO DO LÁTEX DE *E. umbellata* EM COMPARAÇÃO COM A LITERATURA

Continua

Carbono	Literatura δ (ppm)	Experimental δ (ppm)
C-1	35,4	35,2
C-2	28,0	27,9
C-3	79,2	78,9
C-4	39,2	38,9
C-5	51,2	50,9
C-6	19,2	18,9

TABELA 3: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE CARBONO OBSERVADOS PARA O COMPOSTO ISOLADO DO LÁTEX DE *E. umbellata* EM COMPARAÇÃO COM A LITERATURA

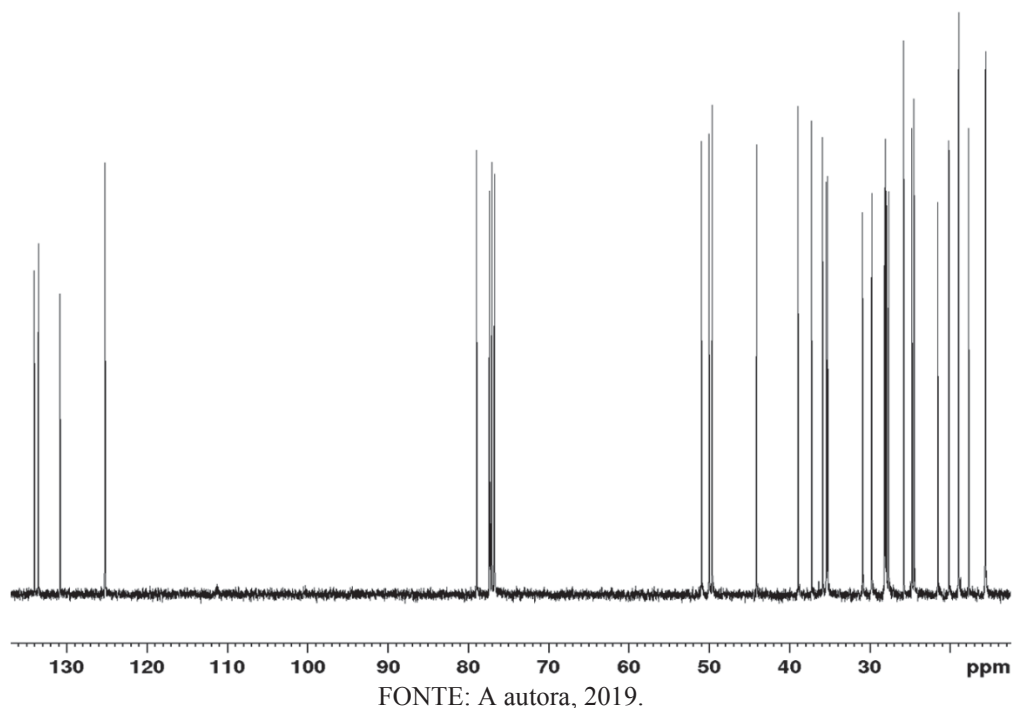
Conclusão

Carbono	Literatura δ (ppm)	Experimental δ (ppm)
C-7	28,0	27,6
C-8	134,3	134,0
C-9	133,8	133,5
C-10	37,5	37,2
C-11	21,7	21,5
C-12	31,1	30,9
C-13	44,3	44,1
C-14	50,2	50,0
C-15	30,0	29,7
C-16	28,3	28,1
C-17	49,9	49,6
C-18	15,8	15,6
C-19	20,4	20,1
C-20	36,1	35,8
C-21	19,1	18,9
C-22	35,7	35,4
C-23	25,0	24,7
C-24	125,4	125,2
C-25	131,1	130,8
C-26	17,9	17,7
C-27	25,9	25,7
C-28	28,2	28,0
C-29	15,5	15,7
C-30	24,4	24,9

NOTA: Resultados comparados com DUTRA et al., 2012b.

FONTE: A autora, 2019.

No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar a presença de 29 sinais, destacando os sinais com deslocamento químico em δ 134,0 e 133,5 ppm referentes aos carbonos C8 e C9, e os deslocamentos em δ 125,2 e 130,8 ppm atribuídos aos carbonos C24 e C25, caracterizando as duplas ligações presentes na estrutura (FIGURA 15).

FIGURA 15: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C PARA A SUB-FRAÇÃO 244-254

A família Euphorbiaceae é amplamente conhecida por apresentar o terpeno eufol na sua composição. Mata et al. (2011) isolaram da fração hexânica do látex de *Euphorbia conspícua* Brown além do composto eufol, seu constituinte majoritário, 15 outros compostos triterpenicos já conhecidos e um inédito denominado 3β -(E)-cinamoileuforbol. Assim como Tsopmo e Kamnaing (2011) que investigando o extrato de acetona de *Euphorbia sapini* De Wild. obtiveram o isolamento de 18 terpenoides entre os quais encontra-se o eufol e outros 2 compostos relatados pela primeira vez nesta espécie e denominados lanost-24-en-20-ol-3-tetradecanoato e euforbolona. Ainda na família Euphorbiaceae, Peng et al. (2012) em estudos fitoquímicos do extrato etanólico da raiz de *Euphorbia kansuie* Liou identificaram três flavonoides, três diterpenos e cinco triterpenoides entre eles o eufol.

Na espécie em estudo, Hassan et al. (2012) isolaram além do eufol, outros dois triterpenos já conhecidos e dois novos ésteres de forbol tipo diterpenos que foram identificados como 3,4,12,13-tetraacetilforbol-20-fenilacetate e 4-deoxiforbol-12,13-ditigliato a partir do extrato clorofórmio das folhas da planta. O triterpeno eufol já foi isolado de outras partes da planta além das folhas, como a casca e o látex. Do látex, a substância foi isolada dos extratos obtidos com os solventes acetona e hexano (DE OLIVEIRA et al., 2013; LUZ et al., 2016; UZABAKILIHU; LARGEAU; CASADEVALL, 1987) e, da casca, a partir dos extratos hidroalcoólico e clorofórmio (KANUNFRE et al., 2017; MUNHOZ et al., 2014).

5.2 ENSAIOS *in vitro* AVALIANDO A ATIVIDADE DO SISTEMA COMPLEMENTO (SC)

Em organismos saudáveis o sistema imunológico mantém-se em equilíbrio. Apesar disso, a função e eficiência do sistema imunológico são influenciados por vários fatores exógenos e endógenos resultando em imunossupressão ou imunoestimulação (JANTAN et al., 2015). As biomoléculas de origem sintética ou biológica são capazes de modular, suprimindo e estimulando quaisquer componentes da imunidade inata e são conhecidas como imunomoduladores (GRIGORE, 2017).

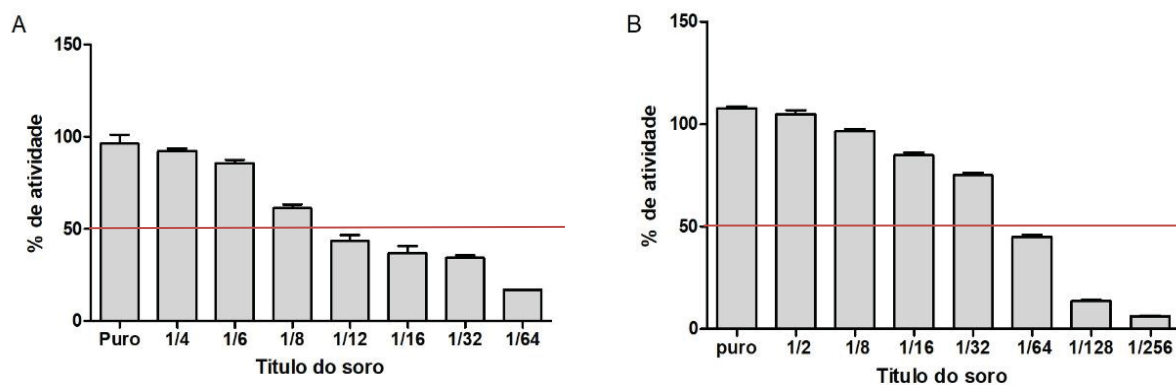
Para avaliar a atividade dessas vias, utiliza-se o ensaio hemolítico, também conhecido como teste de fixação do complemento. O método se baseia na hemólise de eritrócitos causada pelo sistema complemento. Quando os eritrócitos são lisados, liberam a hemoglobina em solução, gerando a coloração vermelha característica que permite a visualização da hemólise induzida pelo complemento (ALBAN et al., 2002; ROOS et al., 2001).

5.2.1 Ensaios de ativação do SC

5.2.1.1 Titulação do SHN para os ensaios hemolíticos

A determinação da CH50 (Complemento hemolítico da via clássica 50%) e AP50 (Complemento hemolítico da VA 50%) de SHN a ser utilizada nos ensaios da VC e da VA, ou seja, a concentração de SHN necessária para provocar 50% lise de eritrócitos de carneiro ou coelho, está representada nas FIGURAS 16A e 16B.

FIGURA 16: CURVA DE TITULAÇÃO DO SHN PARA DETERMINAÇÃO DE AP50 E CH50



NOTA: A- Titulação do soro para via alternativa (AP50). B - Titulação do soro para via clássica (CH50).

FONTE: A autora, 2019.

O cálculo para os valores de CH50 e AP 50 foram feitos a partir da curva de titulação construída com o percentual de hemólise obtido em cada título do SHN e corresponderam a 1:9 e 1:55 respectivamente para VA e VC.

O potencial imunomodulatório foi verificado pela capacidade das amostras de alterarem o valor médio de hemólise do SHN (CH50 e AP50), após seu tratamento, comparando com o valor médio de hemólise do SHN não tratado. Utilizando os títulos referentes o CH50 e o AP50 é possível verificar se o complemento sofre algum tipo de modulação através do aumento ou diminuição de hemólise (ROOS et al., 2001).

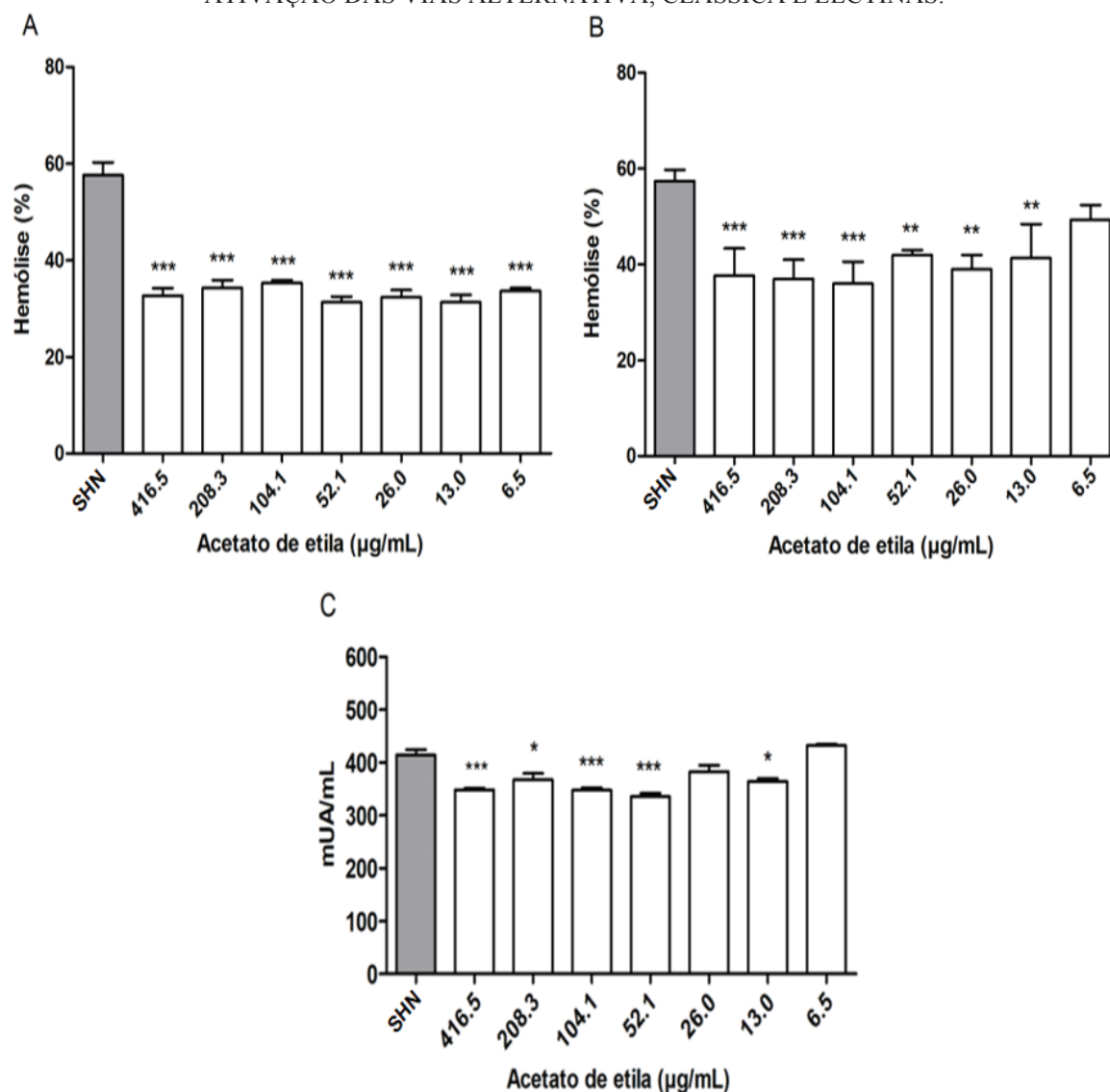
5.2.1.2 Ensaio de ativação do complemento

A presença de certos agentes, como determinados fungos e bactérias, bem como alguns tipos de vírus e helmintos, podem ativar a VA através da ligação de uma ou mais moléculas de C3b na sua superfície. A membrana da hemácia de coelho também possui esta propriedade, por isso é utilizada nos ensaios de ativação desta via (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

Já a ativação da VC ocorre na presença de complexo-imunes, portanto, para avaliação desta via, foram utilizadas hemácias de carneiro (antígeno) sensibilizadas com hemolisina (anticorpo de coelho anti-eritrócitos de carneiro). Por fim, a VL é ativada através da ligação da MBL a carboidratos presentes na superfície de microrganismos alvos, assim, neste experimento a manana foi utilizada para esta ativação.

A fração acetato de etila obtida do látex de *E. umbellata* apresentou inibição das três vias de ativação do complemento, com 43%, 34% e 16% de inibição, respectivamente para a VA, VC e VL na maior concentração testada (416,5 µg/mL) (FIGURA 17). Já a fração metanol apresentou inibição somente da VA e VC com 32% e 50% de inibição, respectivamente na maior concentração testada (416,5 µg/mL) (FIGURA 18). Da mesma forma, a fração hexano foi capaz de inibir a ativação do complemento em duas vias e apresentou 77% e 19% para a VA e VL, respectivamente na maior concentração testada (416,5 µg/mL) (FIGURA 19). Esta fração apresentou ainda efeito inibitório dose-resposta na VA com IC50 de $19,9 \pm 5,3$ µg/mL comparável ao da heparina utilizada como controle positivo (IC50 $11,6 \pm 5,6$ µg/mL).

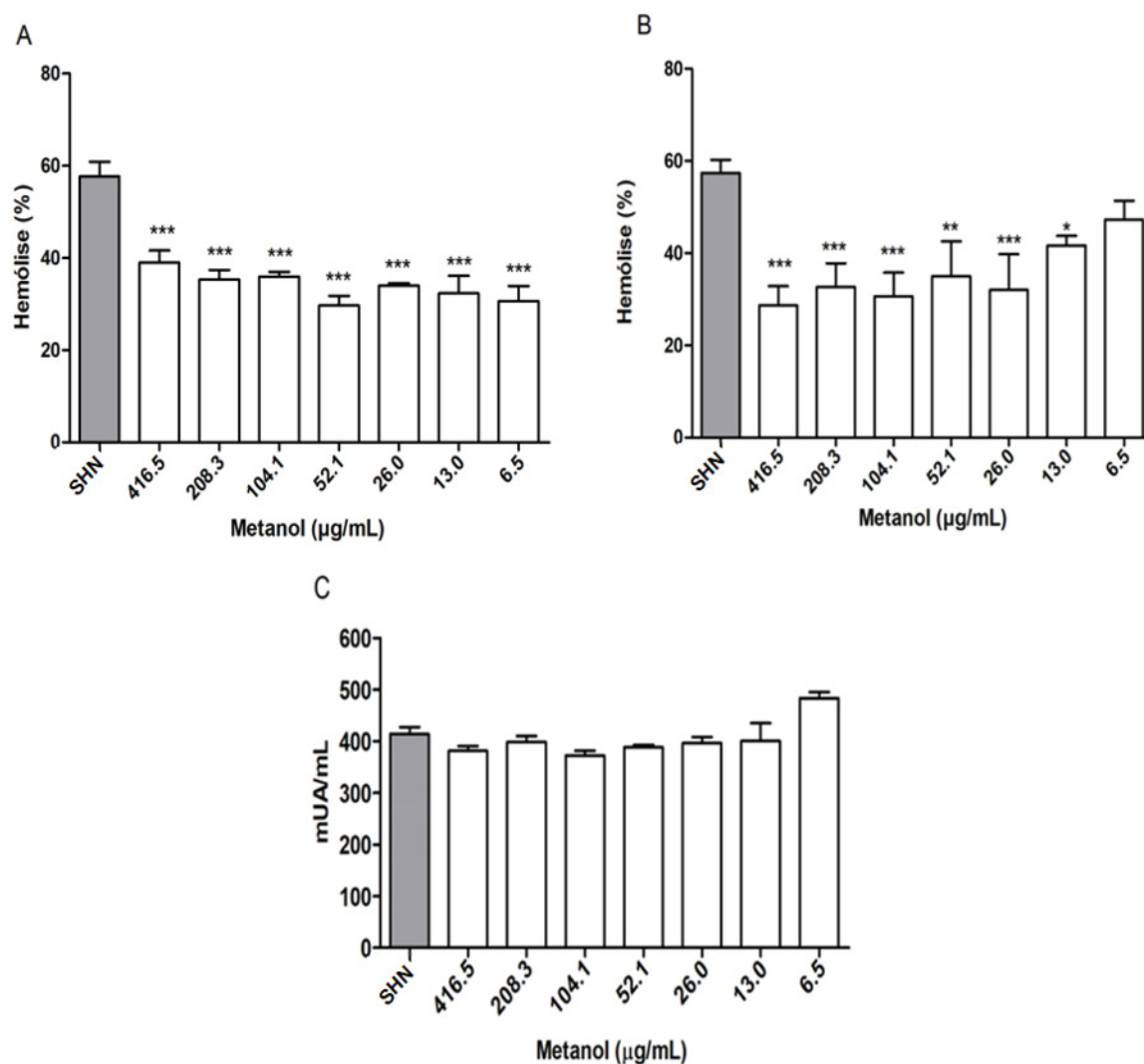
FIGURA 17: EFEITO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA DO LÁTEX DE *E. umbellata* NA ATIVAÇÃO DAS VIAS ALTERNATIVA, CLÁSSICA E LECTINAS.



NOTA: (A) Via alternativa, (B) Via clássica e (C) Via das lectinas. SHN – soro humano normal usado como controle. Os resultados foram expressos em média±DP, e analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey (***p<0,001, **p<0,01 e * p <0,05).

FONTE: A autora, 2019.

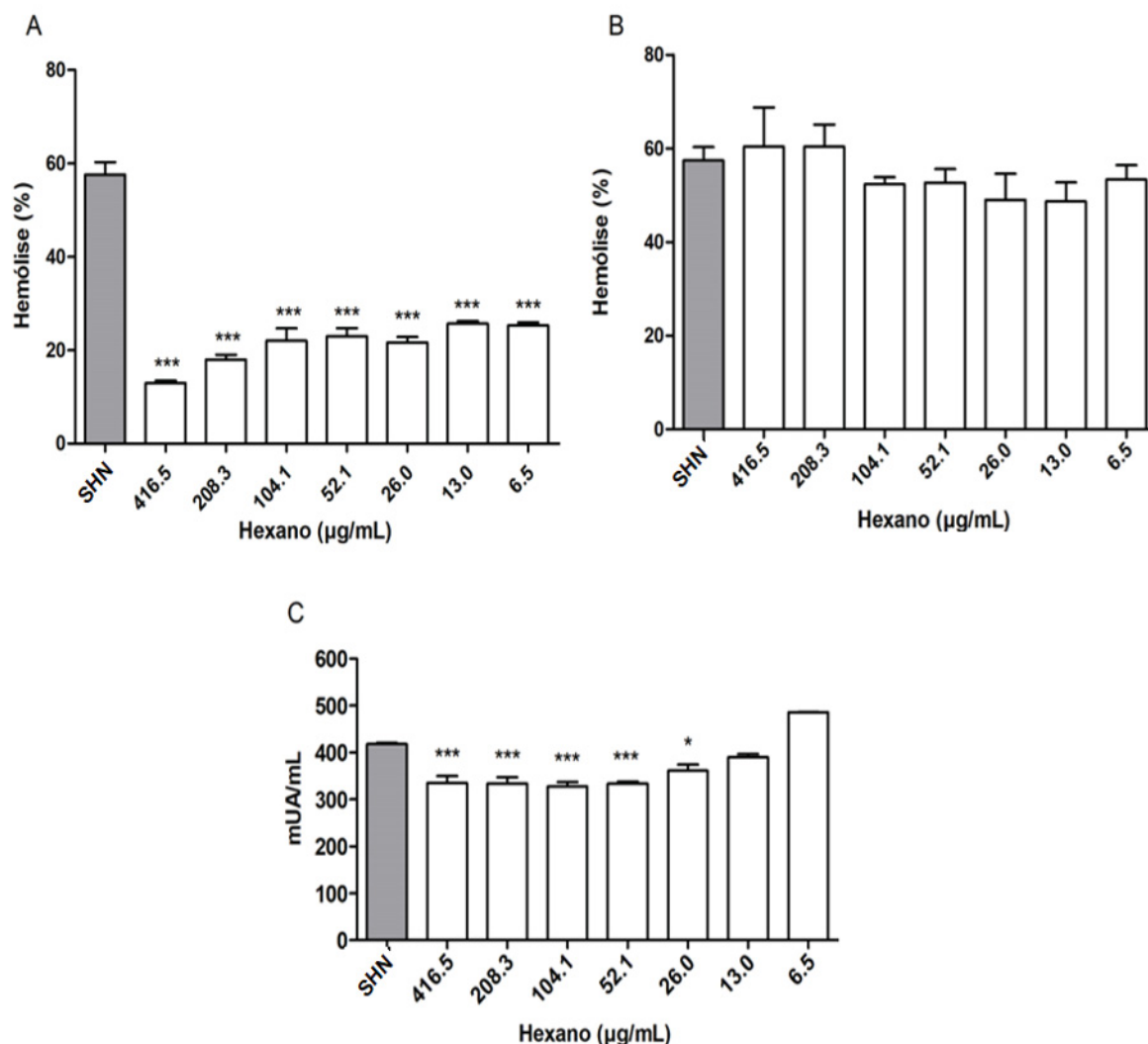
FIGURA 18: EFEITO DA FRAÇÃO METANOL OBTIDA DO LÁTEX DE *E. umbellata* NA ATIVAÇÃO DAS VIAS ALTERNATIVA, CLÁSSICA E LECTINAS.



NOTA: (A) Via alternativa, (B) Via clássica e (C) Via das lectinas. SHN – soro humano normal usado como controle. Os resultados foram expressos em média±DP, e analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey (**p<0,001, **p<0,01 e * p<0,05).

FONTE: A autora, 2019.

FIGURA 19: EFEITO DA FRAÇÃO HEXANO OBTIDA DO LÁTEX DE *E. umbellata* NA ATIVAÇÃO DAS VIAS ALTERNATIVA, CLÁSSICA E LECTINAS.



NOTA: (A) Via alternativa, (B) Via clássica e (C) Via das lectinas. SHN – soro humano normal usado como controle. Os resultados foram expressos em média+DP, e analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey (**p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05).

FONTE: A autora, 2019.

Os resultados obtidos mostram uma atividade imunossupressoras das frações acetato de etila, metanol e hexano do látex de *E. umbellata* sobre a ativação do complemento, em especial na VA, que representa a principal via de ativação do SC, com destaque para a fração hexano (mais apolar) que apresentou o maior percentual de inibição do complemento nesta via com atividade dose-dependente.

Esses resultados vão ao encontro da literatura que, apesar de escassa, mostra que outras espécies dessa família também apresentam atividade anti-complemento. No entanto ao contrário dos resultados deste trabalho, que obteve efeitos inibitórios maiores na VA, os efeitos inibitórios nas vias do complemento apontados na literatura são mais pronunciados na VC.

A avaliação da inibição do complemento pelo látex da planta *Croton panamensis* (Klotzsch) Mull. Arg. resultou em melhor inibição para a VC. Nesse estudo, o látex puro e as frações acetato de etila e éter etílico exibiram uma inibição de 94, 90 e 77% (IC₅₀ 0,43; 0,43 e 0,49 mg/mL), respectivamente, a uma concentração de 1 mg/ml. Já na VA somente o extrato acetato de etila e éter etílico apresentaram efeito inibitório com IC₅₀ de 0,68 e 0,93 mg/mL respectivamente (TSACHEVA et al., 2004). Os mesmos autores, através de técnicas cromatográficas, isolaram o flavonoide miricitrina, o alcaloide taspina e dois ciclopeptídeos (P1 e P2) que apresentaram alta inibição na VC (83, 91, 78 e 63%, respectivamente) a uma concentração de 0,9 µM.

Em outro trabalho, Cos et al. (2002) avaliaram quarenta e dois extratos etanólicos de trinta e seis plantas medicinais, entre elas, duas espécies de Euphorbiaceae, a espécie *Clutia abyssinica* Jaub. et Spach. apresentou IC₅₀ de 47,0 µg/mL e 38,4±1,9 µg/mL respectivamente para VA e VC e a espécie *Macaranga kilimandscharica* Pax. IC₅₀ de 97,3±19,3 µg/mL e 7,1±1,0 µg/mL, respectivamente para VA e VC (COS et al., 2002). Além destas espécies, o extrato clorofórmio:metanol (13:7) do látex de *Croton lechleri* Müll. Arg. também exibiu atividade inibitória do complemento, com IC₅₀ de 185 µg/mL e 5 µg/mL para a VA e VC, respectivamente (RISCO et al., 2003).

A fração hexânica do látex de *E. umbellata* avaliada neste trabalho, apresentou uma potente inibição da VA e comparada a literatura mostrou que o IC₅₀ de 19,9±5,3 µg/mL obtido está entre os mais baixos quando comparado com outras espécies dessa família para esta via. Essa atividade pode ser atribuída aos metabolitos constituintes desta fração, especialmente aos esteroides e terpenos, visto que, a literatura também atribui a essas substâncias, importante ação inibitória do complemento (MIN et al., 2008; SEO et al., 2009).

Resultados parecidos aos do látex de *E. umbellata* foram obtidos com as frações metanol, hexano, clorofórmio, acetato de etila e aquosa obtidos da planta *Orostachys japonicus* A. Berger, que exibiram significativa atividade inibitória do complemento, com destaque para a fração hexano (15,9±0,3 µg/mL) (YOON et al., 2005). Neste mesmo trabalho uma separação cromatográfica dos constituintes guiada por bioensaio resultou no isolamento de três compostos da fração hexano, dentre eles, o esteroide beta-sitosteril-3-O-beta-D-glucopiranosil-6'-O-palmitato exibiu uma potente atividade inibitória do complemento com IC₅₀ 1,0±0,1 µM.

Quanto aos metabólitos secundários terpenoides, Min et al. (2012) avaliando 5 triterpenoides do tipo oleanano verificaram atividade inibitória do complemento em 3 dessas substâncias com IC₅₀ 328,4; 77,5 e 348,6 µM para o ácido 3α,23-di-hidroiolean-12-en-29-óico, ácido 3α-hidroxióico-12-en-23,29-dióico e éster 29-metílico do ácido 3β,4α,20α-3-

hidroxiólico-12-en-23,29-diólico, respectivamente (MIN, 2012). Da mesma forma Seo et al. (2009) encontraram atividade inibitória do complemento para os esteroides peróxido de ergosterol e ergosterol com IC₅₀ de 126,8 e 55,0 µM, respectivamente, e para o triterpeno ácido ganodérico IC₅₀ de 44,7 µM.

A ativação desregulada do SC constitui um importante fator de risco para muitas doenças principalmente as auto imunes, onde ocorre uma resposta imune sustentada que leva a uma lesão inflamatória crônica nos tecidos do hospedeiro (MARKIEWSKI; LAMBRIS, 2007).

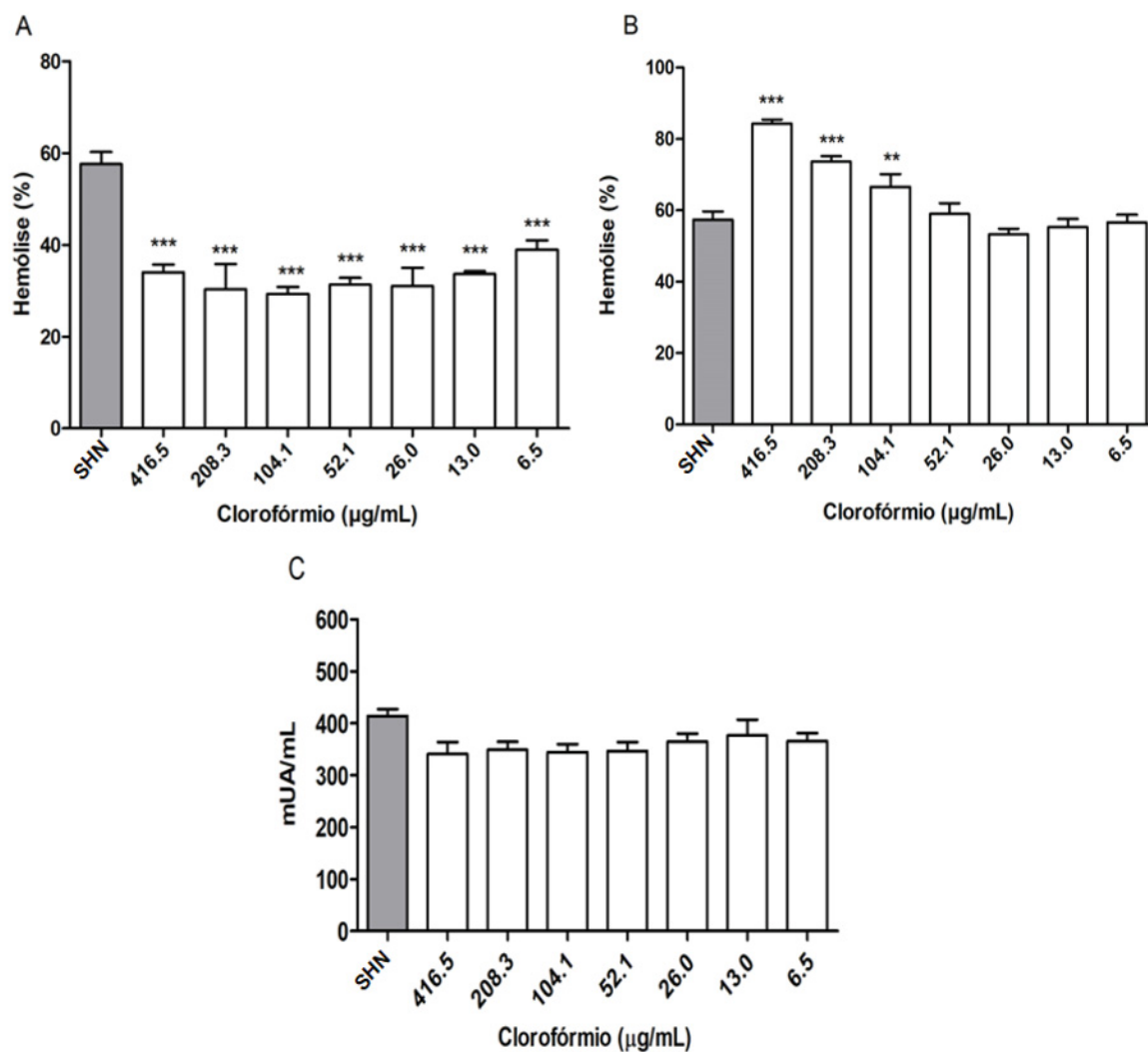
Estudos clínicos de biomarcadores de complemento e estudos em modelos animais sugerem o envolvimento do sistema de complemento na patologia da artrite reumatoide (AR). Os pacientes com AR apresentam níveis de fragmentos de ativação do complemento aumentados e os níveis de proteínas do complemento circulantes diminuem por causa do consumo. Além disso, os fragmentos de ativação do complemento são aumentados no líquido sinovial e no tecido sinovial de pacientes com AR (TROUW; PICKERING; BLOM, 2017).

Além da AR, o SC está envolvido integralmente na patogênese da lesão tecidual no lúpus eritematoso sistêmico (LES). A deposição de imunoglobulina no tecido é uma característica do LES e pode causar a ativação continuada do complemento pela VC (ALEGRETTI et al., 2012). Já em uma das formas de manifestação da síndrome hemolítica urêmica ocorre uma desregulação da enzima C3 convertase da VA do complemento que leva a uma ativação exacerbada e danos teciduais renais (ZIPFEL, 2009).

Dessa forma, as frações metanol, acetato de etila e hexano do látex de *E. umbellata* que apresentaram significativas atividades inibitórias do SC, são potenciais candidatas na busca de novas moléculas que possam contribuir para o tratamento de patologias que visam uma diminuição da atividade do SC. Estudos fitoquímicos de isolamento e identificação destes compostos são necessários para que se atribua a uma determinada substância esta atividade ou a ação sinérgica de substâncias existentes nos extratos e frações.

Já a fração clorofórmio obtida do látex de *E. umbellata* apresentou inibição de 41% da VA, ativação de 47% da VC e não foi capaz de modular a VL na maior concentração testada (416,5 µg/mL) (FIGURA 20). Esta fração apresentou ainda efeito ativador dose-dependente na VC com EC₅₀ (concentração efetiva 50%) de 151,3±10,3 µg/mL. Da mesma forma, o triterpeno eufol, isolado do látex de *E. umbellata*, apresentou inibição da VA e VL com 31% e 32% de inibição respectivamente e ativação de 40% da VC na maior concentração avaliada (977,5 µM) (FIGURA 21).

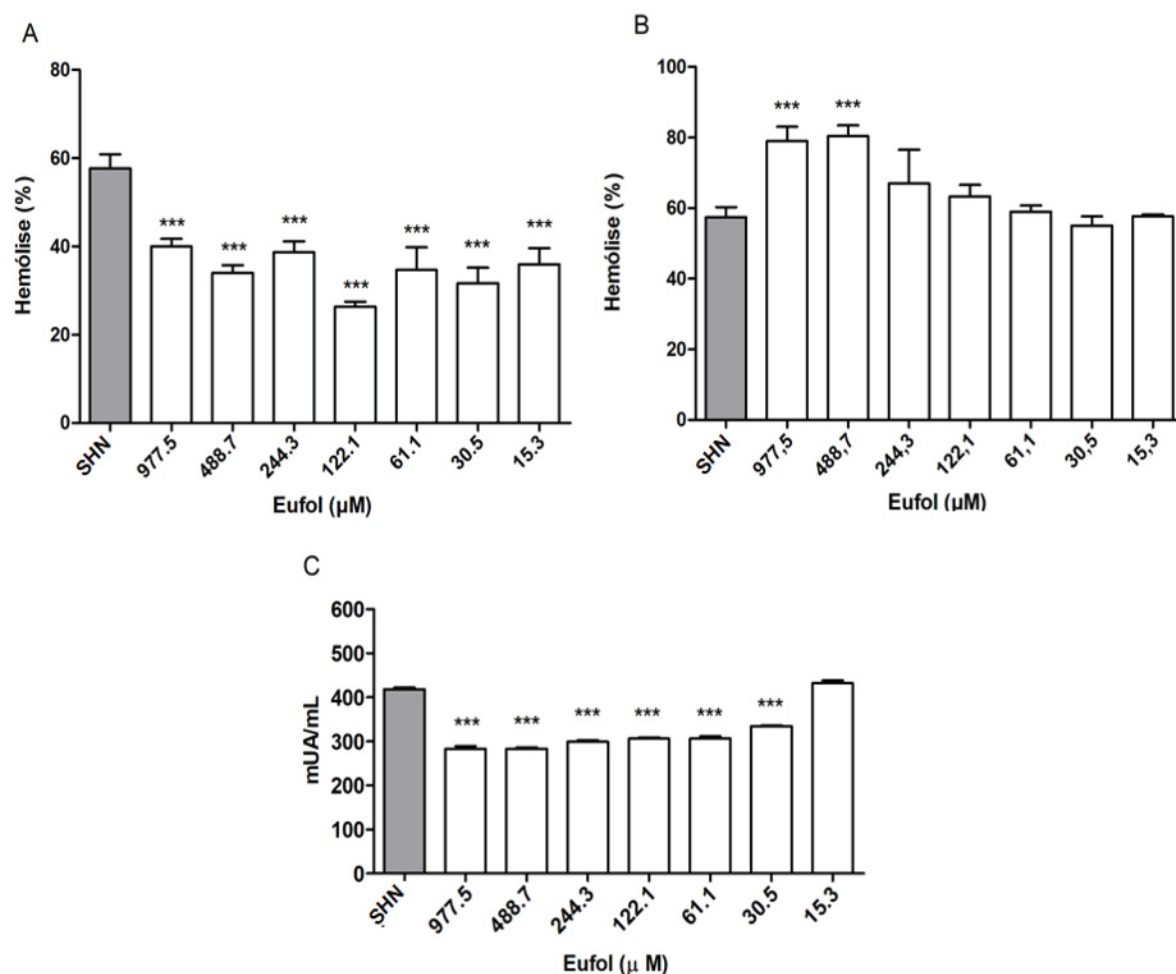
FIGURA 20: EFEITO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO OBTIDA DO LÁTEX DE *E. umbellata* NA ATIVAÇÃO DAS VIAS ALTERNATIVA, CLÁSSICA E LECTINAS.



NOTA: (A) Via alternativa, (B) Via clássica e (C) Via das lectinas. SHN – soro humano normal usado como controle. Os resultados foram expressos em média±DP, e analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey (***p<0,001 e **p<0,01).

FONTE: A autora, 2019

FIGURA 21: EFEITO DO TRITERPENO EUFOL OBTIDO DO LÁTEX DE *E. umbellata* NA ATIVAÇÃO DAS VIAS ALTERNATIVA, CLÁSSICA E LECTINAS.



NOTA: (A) Via alternativa, (B) Via clássica e (C) Via das lectinas. SHN – soro humano normal usado como controle. Os resultados foram expressos em média±DP, e analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey (***) $p < 0,001$.

FONTE: A autora, 2019.

A fração clorofórmio se comportou de forma antagônica, inibiu a VA mas ativou a VC. Esses resultados podem estar associados à composição química, uma vez que os extratos são compostos por misturas complexas e as concentrações de constituintes são ainda desconhecidas.

No entanto, os responsáveis pela atividade de ativação da VC do complemento, podem ser os compostos polifenólicos, já identificados na composição dos extratos de *E. umbellata* (MUNHOZ et al., 2014; MINOZO et al., 2017). Algumas substâncias dessa classe apresentam características de ativação do SC, como é o caso do flavonoide 7-O-rhamnosylsophoroside, extraído das folhas da *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. que, além de apresentar uma potente ativação do complemento, também apresentou atividades distintas nas diferentes vias

de ativação do complemento, assim como a fração clorofórmio do látex de *E. umbellata* (CIMANGA et al., 1997).

O triterpeno isolado do látex da *E. umbellata*, eufol, inibiu a VA e VL mas ativou a VC, essa ativação pode ser mediada pelo recrutamento e ativação de anticorpos naturais dirigida contra a estrutura dessa molécula, gerando uma interação antígeno-anticorpo e ativando a VC do complemento (COURTOIS et al., 2008).

A ativação controlada da VC pode contribuir para a citotoxicidade dependente do complemento, que é considerada o principal mecanismo para a eficácia dos anticorpos monoclonais antitumorais (REIS et al., 2018). O rituximabe, um anticorpo contra células B malignas, está entre os anticorpos monoclonais terapêuticos mais antigos e amplamente utilizados. Sendo que seus benefícios terapêuticos são mediados principalmente pela indução do ataque do complemento em células B malignas pela ativação da VC do complemento (MELIS et al., 2015).

Já a atividade inibitória na VA do terpeno isolado, eufol, foi inferior à dos extratos principalmente das frações mais apolares (hexano e clorofórmio), nas quais, essa classe de metabólito se concentra em maior quantidade. A maior concentração avaliada do eufol, 977,5µM, foi capaz de inibir 31% da VA, já as frações apresentaram inibição de 77%, 41%, 43% e 32% respectivamente para a fração hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.

Esse fato nos leva a conclusão de que não devemos considerar que uma substância, embora majoritária, possa apresentar o mesmo efeito quando isolada, e que neste trabalho, no que se refere a ação de inibição do complemento pela VA, pode-se afirmar que o que prevalece é a ação sinérgica dos compostos encontrados nas frações do látex ou que existem outras substâncias mais potentes relacionadas com essa atividade. Quando um extrato inteiro é usado, há uma boa chance de sinergismo entre os componentes ativos que podem ser perdidos quando cada um desses componentes é isolado (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016).

5.3 QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS

O ensaio com a câmara de Boyden, originalmente introduzido por Boyden para a análise da quimiotaxia de leucócitos, é baseado em uma câmara de dois compartimentos separados por uma membrana microporosa que representa uma barreira física. As células são colocadas no compartimento superior e podem migrar através dos poros da membrana para o compartimento inferior, no qual estão presentes agentes quimiotáticos. Após incubação, a membrana entre os

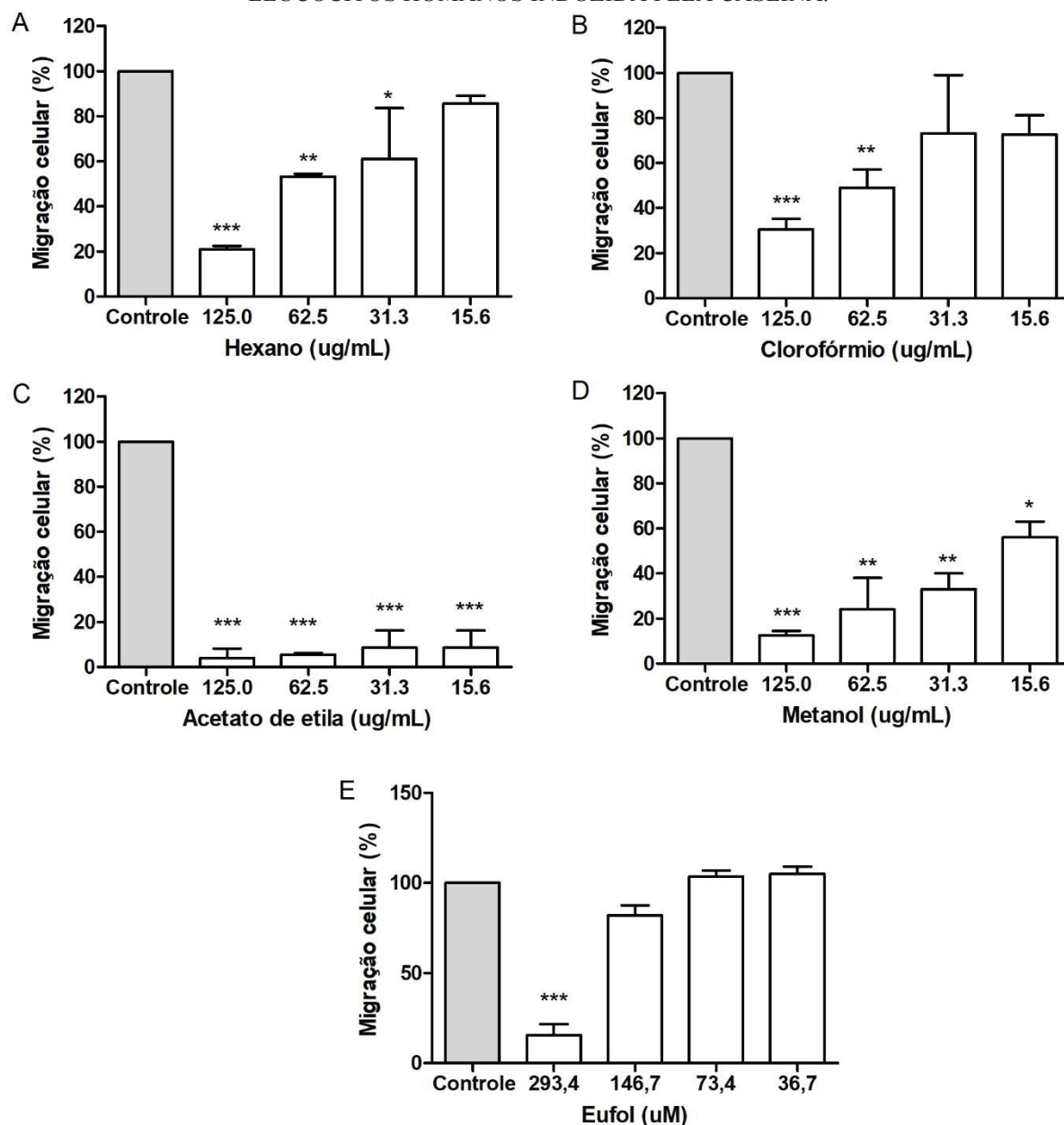
dois compartimentos é removida, e o número de células que migraram para o lado inferior da membrana é determinado (FALASCA; RAIMONDI; MAFFUCCI, 2011).

As substâncias capazes de induzir quimiotaxia, denominadas quimioatraentes, não constituem uma classe específica de compostos e podem ter natureza exógena ou endógena. Dentre as substâncias exógenas que provocam alterações no comportamento locomotor dos leucócitos encontram-se alguns produtos de bactérias, como os peptídios N-formilados (fMLP), certas proteínas como a caseína, os derivados de bactérias como os lipopolissacarídeos, proteínas desnaturadas, entre outras (JOHANSSON et al., 2002).

Usando esse sistema, investigou-se o comportamento de neutrófilos humanos obtidos de indivíduos sadios na quimiotaxia induzida por caseína quando previamente tratados com as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, e o triterpeno isolado eufol. Os resultados estão apresentados na Figura 22, onde cada coluna representa, na dose indicada, a percentagem de células recuperadas no compartimento inferior das câmaras em relação à população controle, não tratada, normalizada em 100%.

A exposição de neutrófilos humanos a diferentes concentrações das frações do látex de *E. umbellata* resultou numa inibição dose-dependente na migração dessas células. A fração hexano apresentou 79%, 47% e 39% de inibição nas concentrações de 125,0; 62,5 e 31,2 µg/mL respectivamente. A fração clorofórmio apresentou 69% e 51% de inibição nas maiores concentrações testadas 125,0 e 62,5 µg/mL respectivamente. A fração acetato de etila apresentou inibição da migração leucocitária em todas as concentrações testadas e foi a que apresentou o maior percentual de inibição como 96%, 94%, 91% e 91% para as concentrações 125,0; 62,5; 31,2 e 15,6 µg/ml respectivamente. A fração metanol também foi capaz de inibir a migração dos neutrófilos em todas as concentrações avaliada e apresentou 87%, 76%, 67% e 44% de inibição nas concentrações 125,0; 62,5; 31,2 e 15,6 µg/ml respectivamente. Já o eufol foi capaz de inibir a migração dos neutrófilos somente na maior concentração testada, 293 µM, apresentando 84% de inibição (FIGURA 22).

FIGURA 22: EFEITO DAS FRAÇÕES DO LÁTEX DE *E. umbellata* SOBRE A QUIMIOTAXIA DE LEUCÓCITOS HUMANOS INDUZIDA PELA CASEÍNA.



NOTA: A – fração hexano, B – fração clorofórmio, C- fração acetato de etila, D – fração metanol e E – eufol. Cada coluna representa a média e o desvio padrão do percentual de células migradas em relação as não-tratadas (normalizada em 100%), de experimentos independentes, e foram analisados pelo teste de ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey (***p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05).

FONTE: A autora, 2019.

As frações de *E. umbellata* apresentaram significativa inibição da quimiotaxia de neutrófilos induzida por caseína, com destaque para a fração acetato de etila que apresentou mais de 90% de inibição em todas as concentrações testadas.

Esses resultados mostram que a espécie *E. umbellata* apresenta uma atividade anti-inflamatória que pode estar relacionada a um efeito simultâneo interativo de inibição do SC e à

sua capacidade de alterar os mecanismos que envolvem o recrutamento de células envolvidas na resposta inflamatória.

A indução de quimiotaxia pela caseína está relacionada a sua capacidade de se ligar a receptores opioides acoplados a proteína G presentes nos neutrófilos, essa ligação inicia eventos de sinalização que promovem a polarização de neutrófilos e a migração direcional (NARDIN et al., 2008; PRESIBELLA; SANTOS; WEFFORT-SANTOS, 2003). Já a inibição desses receptores, leva à inibição da quimiotaxia dessas células, tanto para fatores quimiotáticos derivados do complemento quanto para as quimiocinas (ROGERS et al., 2006). Dessa forma a atividade de inibição da quimiotaxia pelas frações do látex de *E. umbellata* e pelo eufol podem ser atribuídas ao bloqueio dos receptores opioides.

A literatura mostra que a família Euphorbiaceae apresenta espécies que exibem atividade em receptores opioides. O óleo essencial das folhas da espécie *Croton conduplicatus* Kunth apresentou efeito antinociceptivos, ansiolíticos e sedativos em diferentes modelos experimentais *in vivo* e os resultados são devido a interação com vários receptores entre eles os opioides (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2018). Assim como o óleo essencial da espécie *Croton rhamnifolioides* Pax que apresentou atividade gastroprotetora cujo mecanismo está relacionado à modulação de receptores opioides e óxido nítrico.

A interação entre extratos de *E. umbellata* e receptores opioides também já foi demonstrada. O extrato etanólico das folhas de *S. umbellatum* (sinonímia *E. umbellata*) apresentou atividade antinociceptiva em modelos *in vivo* de avaliação através da ação em receptores opióides periféricos (BORGES et al., 2013).

Os neutrófilos são células importantes do sistema imunológico inato, envolvidos na coordenação da iniciação, propagação e resolução da inflamação. A migração precisa de neutrófilos (quimiotaxia) para locais de inflamação em resposta a gradientes de quimioatraentes é essencial para esses papéis (JOHANSSON et al., 2002). No entanto, certas doenças inflamatórias como artrite reumatoide, doença pulmonar obstrutiva crônica e dermatites são caracterizadas por inflamação neutrofílica excessiva (MICHAEL; VERMEREN, 2019). Dessa forma, a inibição da migração dos neutrófilos pode constituir uma importante alternativa para o tratamento de diversas doenças inflamatórias (NARDIN et al., 2008).

A atividade acentuada da fração acetato de etila pode ser devido a toxicidade do extrato. Os neutrófilos apresentaram alta viabilidade (> 90%) após incubação por 30 minutos com as frações nas concentrações testadas (15,6 a 125 µg/mL), exceto a fração acetato de etila, que apresentou uma viabilidade celular de 70% após incubação. A viabilidade celular elevada das frações hexano, clorofórmio e metanol indicam que os compostos são atóxicos para os

neutrófilos e foram capazes de modular a resposta imune celular. Já a baixa viabilidade para o acetato de etila indica que os neutrófilos podem ter perdido a capacidade de migração devido a toxicidade do extrato e não pela modulação de receptores opioides.

O triterpeno eufol apresentou alta viabilidade (> 90%) após incubação por 30 minutos nas concentrações testadas (36,7 a 293 μ M) mas apresentou atividade inibitória da quimiotaxia somente na maior concentração avaliada (293,4 μ M).

Alguns terpenoides apresentam significativa atividade inibitória da quimiotaxia de neutrófilos como o 28,28,30-tri-hidroxiupeol, ácido 3,21,21,26-tetra-hidroxi-lanostanóico, ácido desidroxibetulínico, taraxerona, palmitato de etila e ácido ursólico que apresentaram IC₅₀ de 6,8; 2,8; 2,5; 4,1; 3,7 e 3,6 μ M respectivamente (MAWA; JANTAN; HUSAIN, 2016).

No entanto segundo Mawa et al. (2016) a relação entre a estrutura química e a atividade imunomoduladora dos triterpenos isolados pode estar relacionada a presença de um grupo oxigenado no C-3 e um grupo carboxila no C-28. A estrutura do eufol não apresenta o grupo carboxila no C-28 o que poderia ter diminuído sua atividade inibitória da quimiotaxia.

Apesar disso, outros terpenos que não apresentam esse grupamento químico no C-28 se destacam como potentes antiinflamatórios com ação inibitória da migração de neutrófilos. O triterpeno pentacíclico taraxasterol, um dos principais constituintes ativos do gênero *Taraxacum*, tem efeito na AR induzida em ratos, devido, entre outras causas, a diminuição da infiltração de células inflamatórias e inibição dos níveis séricos de interleucinas e prostaglandinas (WANG et al., 2016b).

Da mesma forma, o triterpeno tetracíclico isômero do eufol, tirucalol, extraído do látex de *Euphorbia lactea* Haw exibiu uma ação anti-inflamatória eficaz no edema de ouvido de ratos induzido por acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) através de um mecanismo relacionado à inibição da migração de neutrófilos (FERNANDEZ-ARCHE et al., 2010). Assim, pode-se afirmar que outras estruturas moleculares e suas conformações espaciais podem estar relacionadas a essa atividade ou a inibição da migração de neutrófilos por essas substâncias pode acontecer via outros receptores presentes nos neutrófilos.

5.4 ENSAIOS CELULARES

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* são métodos rápidos para triagem de produtos naturais e sintéticos com potencial atividade antitumoral. Muitos pesquisadores têm usado a cultura de células para avaliar a citotoxicidade de compostos com potencial atividade terapêutica de

produtos naturais e resultados promissores têm sido obtidos (CENDALES; SUAREZ, 2016; DA MOTA et al., 2012; IVANOVA; UHLIG, 2008).

Segundo Ivanova e Uhlig (2008), os ensaios de citotoxicidade podem responder de forma diferente às substâncias testes sendo recomendado a utilização de mais de uma metodologia. Os ensaios de citotoxicidade realizados nesse trabalho incluíram avaliar a viabilidade celular por duas metodologias distintas, os quais fornecem informações sobre a susceptibilidade de organelas celulares. Enquanto o ensaio com o MTT é baseado na avaliação de atividade mitocondrial da célula, o corante VN avalia a capacidade da célula de incorporar e ligar o corante aos lisossomos.

O ensaio colorimétrico de redução do MTT, para a avaliação de integridade mitocondrial, foi realizado conforme descrito por Mosmamm (1983). O princípio do método é a redução de um substrato amarelo, o sal de tetrazolium MTT, por enzimas mitocondriais resultando em um produto azul/roxo. Desta forma esta reação ocorre somente em células vivas e que estejam com suas mitocôndrias ativas (MOSMANN, 1983).

Já corante vital vermelho neutro, é solúvel em água e atravessa a membrana celular por difusão passiva, concentrando-se nos lisossomos e fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal (ROGERO et al., 2005). A absorção do corante depende da capacidade da célula de manter gradientes de pH, através da produção de ATP. Em pH fisiológico, o corante apresenta uma carga líquida próxima de zero, permitindo que ele penetre nas membranas da célula. Dentro dos lisossomos, há um gradiente de prótons para manter um pH menor que o do citoplasma. Assim, o corante fica carregado e é retido no interior dos lisossomos das células viáveis (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Portanto em ambas as metodologias é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular após a aplicação do corante ou substrato.

5.3.1 Ensaios de citotoxicidade por redução mitocondrial de MTT

Na avaliação da citotoxicidade do Eufol foram usadas células da linhagem HRT18, B16F10 e fibroblastos 3T3 em 24, 48 e 72 horas de tratamento. Na FIGURA 23 estão os resultados da responsividade dessas células frente ao tratamento com eufol que demonstram uma atividade citotóxica concentração dependente sem seletividade para as linhagens tumorais. Além disso, todas as linhagens avaliadas apresentaram um aumento da citotoxicidade com o

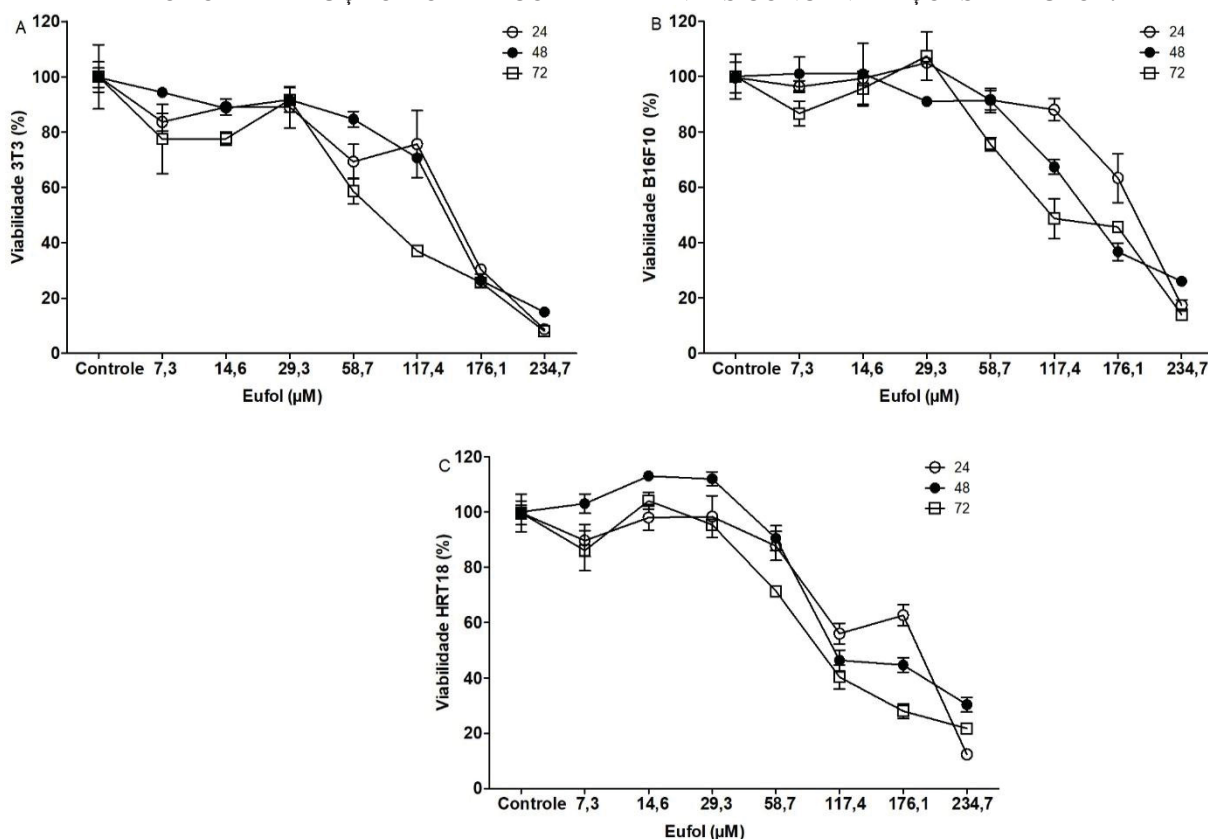
aumento da concentração de eufol, no entanto o aumento da citotoxicidade não é observado com o aumento do tempo de incubação em todas as concentrações.

Os fibroblastos 3T3 apresentaram diminuição de viabilidade pelo eufol semelhante as linhagens B16F10 e HRT18. A partir da concentração de 14,6 μM todos os tempos de incubação apresentaram diminuição da viabilidade celular e na concentração de 7,3 μM somente o tempo de 72 horas mostrou essa atividade (FIGURA 23).

Para a linhagem B16F10 foi observada atividade citotóxica significativa a partir da concentração 117,4 μM em todos os tempos de incubação, já a concentração de 58,7 μM apresentou diminuição da viabilidade celular somente com 72 horas de incubação (FIGURA 23).

Da mesma forma, a linhagem HRT18 apresentou atividade citotóxica a partir da concentração 117,4 μM em todos os tempos de incubação e na concentração de 58,7 μM somente com 72 horas de incubação ocorreu uma significativa diminuição da viabilidade celular (FIGURA 23).

FIGURA 23: VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS 3T3, B16F10 E HRT18 AVALIADA PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EUFOL.



NOTA: A- Linhagem 3T3, B- B16F10 e C- HRT18. Como controle negativo foi utilizado DMSO 0,5%. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão da média.

FONTE: A autora, 2019.

Esses resultados mostram que o eufol foi capaz de reduzir a viabilidade de todas as células avaliadas de forma dose dependente. No entanto, ensaios baseados na metodologia de redução do MTT podem ser influenciados pela presença de substâncias químicas com capacidade redox, como fitoestrógenos, polifenóis, vitaminas e alguns compostos metálicos (GOMEZ PEREZ et al., 2017; WANG; HENNING; HEBER, 2010).

Além disso, as substâncias antioxidantes podem interferir na avaliação da citotoxicidade pela metodologia de redução do MTT induzindo falsos resultados positivos (BRUGGISSER et al., 2002). Não existem relatos na literatura sobre atividade antioxidante do eufol mas os extratos obtidos a partir da planta apresentam esta atividade (MUNHOZ et al., 2014; MINOZO et al., 2016). Por isso, avaliou-se a citotoxicidade do eufol nas linhagens celulares B16F10, HRT18 e 3T3 por meio do ensaio de vermelho neutro, que depende da habilidade da célula em acumular corante nos lisossomos.

5.2.2 Ensaios de citotoxicidade por internalização lisossomal de vermelho neutro (VN)

A citotoxicidade de eufol frente as linhagens em estudo (HRT18, B16F10 e fibroblastos 3T3) avaliada através da internalização de vermelho neutro pelos lisossomos, de forma semelhante ao MTT, possibilitaram a confirmação da citotoxicidade do eufol.

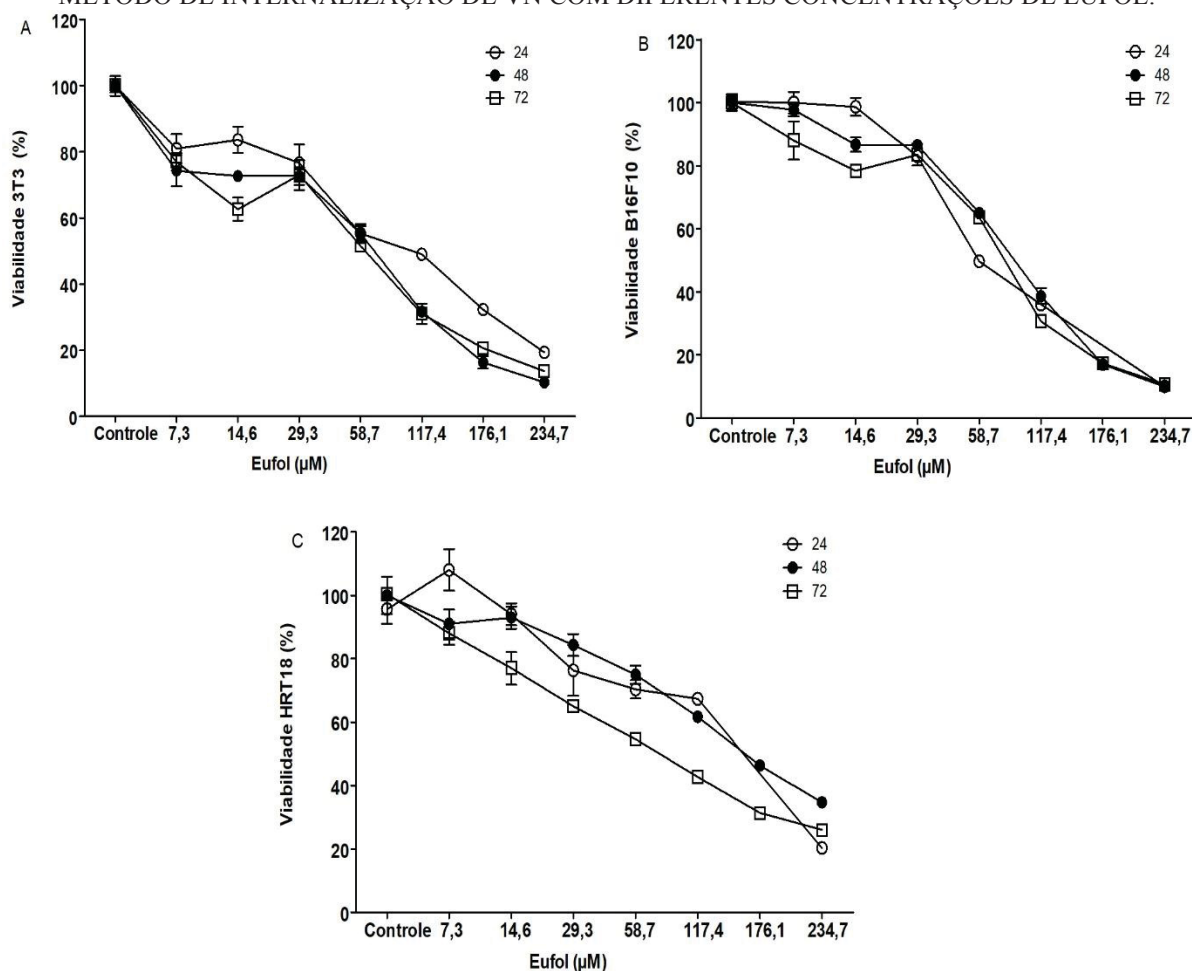
Das 3 linhagens avaliadas os fibroblastos 3T3 foram os mais suscetíveis a diminuição de viabilidade pelo eufol. Com 24 horas de incubação já se observa perda de viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas, e nos tempos de 48 e 72 horas de incubação essa atividade se mantém (FIGURA 24).

Para a linhagem B16F10 foi observada uma maior sensibilidade das células para o eufol quando avaliadas por essa metodologia. Todos os tempos apresentaram inibição significativa a partir da concentração 29,3 μM . Já na concentração de 14,6 μM somente os tempos de 48 e 72 horas de incubação apresentaram diminuição da viabilidade celular significativa e na concentração de 7,3 μM somente em 72 horas de incubação ocorreu inibição significativa (FIGURA 24).

Da mesma forma, a linhagem HRT18 foi mais sensível ao eufol quando avaliada por esta metodologia. Em todos os tempos de incubação percebe-se diminuição significativa da viabilidade celular a partir concentração de 29,3 μM , na concentração de 14,6 μM somente com 72 horas de incubação ocorreu diminuição da viabilidade celular significativa e na concentração de 7,3 μM não ocorreu inibição significativa em nenhum tempo avaliado (FIGURA 24). Assim

como na avaliação de citotoxicidade pelo MTT, o efeito citotóxico observado se mostrou dose dependente.

FIGURA 24: VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS 3T3, B16F10 E HRT18 AVALIADA PELO MÉTODO DE INTERNALIZAÇÃO DE VN COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EUFOL.



NOTA: A- Linhagem 3T3, B- B16F10 e C- HRT18. Como controle negativo foi utilizado DMSO 0,5%. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão da média.

FONTE: A autora, 2019.

Pode-se observar uma sensibilidade maior na detecção de viabilidade celular no ensaio com o corante VN. O ensaio de citotoxicidade utilizando esse corante é baseado na habilidade de células viáveis de incorporar e fixar a molécula de vermelho neutro em seus lisossomos, sendo um teste mais sensível que outros testes citotóxicos, como o MTT (REPETTO, DEL PESO e ZURITA, 2008).

Estudos anteriores descritos na literatura relatam citotoxicidade de diversas espécies do gênero *Euphorbia* como *Euphorbia macrostegia* Boissier, *Euphorbia formosana* Hayata, *Euphorbia lathyris* Linnaeus, *Euphorbia kansui* Liou, sendo os terpenos os principais

metabólitos responsáveis por essa atividade (BANIADAM; REZA; GHANNADIAN, 2014; TENG et al., 2019; VASAS; HOHMANN, 2014; YANG et al., 2013)

Wang et al. (2016) isolaram nove novos terpenos do látex de *Euphorbia resinífera* Berg além de seis já conhecidos e avaliaram suas atividades citotóxicas contra linhagens de células cancerosas MCF-7 (carcinoma de mama), U937 (linfoma) e C6 (glioblastoma). A maioria dos terpenos apresentou atividade citotóxica moderada, com destaque para o (24R)-eupha-8,25-diene-3 β ,24-diol que apresentou maior potência contra as células com valores de IC₅₀ de 56,2 μ M, 34,6 μ M e 49,6 μ M, respectivamente (WANG et al., 2016a).

Da mesma forma, Fatope et al. (1998) realizaram um fracionamento biomonitorado do látex de *Euphorbia poisonii* Pax que resultou no isolamento e caracterização de um novo diterpeno tiglane, o 12-deoxiforbol 13-(9,10-metileno) undecanoato, juntamente com cinco diterpenos conhecidos, que foram avaliados quanto à citotoxicidade em um painel de seis linhas celulares de tumores sólidos humanos (A-549 carcinoma do pulmão, MCF-7 carcinoma da mama, HT-29 adenocarcinoma cólon, A-498 carcinoma renal, PC-3 adenocarcinoma da próstata e PACA-2 carcinoma pancreático), quatro ésteres de diterpenos, foram seletivamente citotóxicos para a linha celular de carcinoma renal humano (A-498) com potência superior a do controle positivo (FATOPE et al., 1996).

A espécie *E. umbellata* também apresenta atividades citotóxicas atribuídas aos metabólitos constituintes das frações mais apolares, das quais os terpenos fazem parte (OLIVEIRA et al., 2013, KANUNFRE et al., 2017). Luz et al. (2016) avaliando as frações metanol, acetato de etila, clorofórmio e hexano do látex de *E. umbellata* frente as linhagens Hela, HRT18 e Jurkat, obtiveram melhores resultados citotóxicos com a fração obtida com o solvente hexano e apontam a presença dos metabólitos da classe dos terpenos e esteroides nesta fração, que poderiam ser os responsáveis pela atividade.

Eufol é o principal composto da fração hexano do látex de *E. umbellata*, entretanto, há poucos relatos na literatura sobre sua citotoxicidade. Devido a isso, a citotoxicidade desta substância foi avaliada neste trabalho. Nas duas metodologias propostas (VN e MTT), houve diminuição significativa da viabilidade celular das linhagens em estudo (tumoriais – HRT18 e B16F10 e normal – 3T3).

Luz et al. (2016) isolaram esse terpeno da fração hexânica do látex de *E. umbellata* e avaliaram sua citotoxicidade em culturas de células Jurkat pela metodologia de redução do MTT. Eufol foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 43,8% na concentração de 50 μ g/mL com 72 horas de incubação, resultado inferiores aos observados neste trabalho, onde obteve-se

71% de inibição para B16F10 e 55% para HRT18 pela mesma metodologia com a mesma concentração (117,4 μM de eufol correspondem a 50 $\mu\text{g/mL}$).

Além destas linhagens, eufol já apresentou importantes efeitos citotóxicos em culturas de células tumorais gástricas (CNS, CS12, AGS, MKN45 e CRL-1739), de pulmão (CCL-64) e mama (T47D) (CHEN et al., 2015; LIN et al., 2012; WANG et al., 2013), e os autores afirmam que a substância é um agente potencialmente promissor para o desenvolvimento de quimioterápico contra o câncer. Além disso, eufol exibiu interações sinérgicas com gemcitabina e paclitaxel em linhagens de células pancreáticas e esofágicas, respectivamente (SILVA et al., 2018).

5.2.3 Avaliação de citotoxicidade por cálculo de IC50

A citotoxicidade é melhor avaliada através da concentração estimada para reduzir em 50% o número de células viáveis (IC50), que corresponde a concentração de morte celular de 50% das células de uma cultura. O triterpeno eufol apresentou atividade citotóxica nas linhagens avaliadas pelas duas metodologias utilizadas, conforme mostrado anteriormente. Assim, com base nos resultados obtidos nos experimentos de citotoxicidade pelas duas metodologias, os valores de IC50 foram calculados para as três linhagens testadas nos três tempos avaliados (TABELAS 4 e 5).

TABELA 4: IC50 ($\mu\text{M} \pm \text{DP}$) DO EUFOL PARA AS CÉLULAS DE MELANOMA (B16F10), CÂNCER COLO RETAL (HRT18) E FIBROBLASTOS 3T3 PELA METODOLOGIA DO VN.

	B16F10	HRT18	3T3
24 h	68,8 \pm 5,3	125,3 \pm 11,0	76,5 \pm 7,3
48 h	80,2 \pm 5,0	153,3 \pm 5,9	44,0 \pm 8,2 a
72 h	62,7 \pm 7,6 b	70,7 \pm 4,3 ab	39,0 \pm 6,5 a

NOTA: Diferenças significativas em relação ao tempo são representadas por **a** vs 24h e **b** vs 48h ($p < 0,05$).

FONTE: A autora, 2019.

TABELA 5: IC50 ($\mu\text{M} \pm \text{DP}$) DO EUFOL PARA AS CÉLULAS DE MELANOMA (B16F10), CÂNCER COLO RETAL (HRT18) E FIBROBLASTOS 3T3 PELA METODOLOGIA DO MTT.

	B16F10	HRT18	3T3
24 h	81,9 \pm 15,2	118,4 \pm 75,7	91,28 \pm 12,3
48 h	70,4 \pm 8,6	157,75 \pm 19,3	65,8 \pm 10,6 a
72 h	53,6 \pm 10,1 ab	69,8 \pm 7,3 ab	40,0 \pm 13,9 a

NOTA: Diferenças significativas em relação ao tempo são representadas por **a** vs 24h e **b** vs 48h ($p < 0,05$).

FONTE: A autora, 2019.

Os resultados dos IC₅₀ pelas duas metodologias utilizadas apresentaram perfis semelhantes e mostraram uma toxicidade tempo dependente para todas as linhagens quando comparados os resultados de IC₅₀ entre 24 e 72 horas. No entanto, os valores obtidos de IC₅₀ para as linhagens tumorais (B16F10 e HRT18) são superiores ao estabelecido pelo programa de triagem do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, que estabelece que para uma substância purificada seja considerada como tendo atividade citotóxica *in vitro*, os valores de IC₅₀ obtidos devem ser menor que 4 µg/mL (9,5 µM para a molécula do eufol) (ASSAF et al., 2013).

Resultados semelhantes foram obtidos por Lin et al. (2012) que demonstram efeito citotóxico do eufol, após 72 horas de tratamento, contra linhagens de câncer gástrico (CNS, CS12, AGS e MKN45) através da técnica de redução do sal tetrazólio, obtendo IC₅₀ de 116,2, 30,0, 34,4 e 33,7 µM, respectivamente e Wang et al. (2013) que avaliaram o efeito do eufol na linhagem de câncer de mama T47D e obtiveram IC₅₀ entre 130-260 µM em 72h de tratamento.

Por outro lado, estudos recentes encontraram valores de IC₅₀ mais promissores para o eufol utilizando outras linhagens celulares. Silva et al. (2018a) avaliaram a citotoxicidade de eufol frente a doze linhagens celulares humanas imortalizadas de glioblastoma, e da mesma forma que neste trabalho, encontraram resultados citotóxicos dependentes da concentração, mas os valores de IC₅₀ encontrados foram mais baixos do que os desta pesquisa. A média dos IC₅₀ foi de 19,38 µM, e os valores variaram significativamente entre linhagens celulares individuais (intervalo IC 50: 5,98 – 31,05 µM) (SILVA et al., 2019).

Outro estudo avaliou o efeito citotóxico do eufol em um painel de 73 linhas de câncer humano de 15 tipos de tumores. As células apresentaram um perfil heterogêneo de resposta ao eufol com IC₅₀ que variaram de 1,41-38,89µM (LNCaP próstata e T47D mama, respectivamente). Entretanto, foram observados efeitos citotóxicos em todas as linhagens celulares de câncer, com mais da metade sensível. Entre as linhagens avaliadas, 10 eram de tumores de cólon e 10 de melanoma, os valores médios de IC₅₀ para essas linhagens foram de 6,3 e 9,3µM, respectivamente (SILVA et al., 2018a).

A avaliação da citotoxicidade pelo cálculo de IC₅₀ comumente apresenta variação em seus resultados, mesmo se tratando da mesma linhagem. Esta questão é atribuída principalmente a diferenças nas características de proliferação e densidade celular, se houver algum fator que altere a taxa proliferativa das células controle o valor da IC₅₀ será alterado (HE et al., 2016).

5.2.4 Índice de Seletividade

Ao avaliar a citotoxicidade de compostos em células cancerígenas se faz necessário também analisar a toxicidade em células não neoplásicas, através do índice de seletividade. A literatura descreve que valores de IS inferiores a 2 indicam toxicidade geral não específica (AYESH; ABED; FARIS, 2014). O IS é a razão entre o IC50 de células não neoplásicas e o IC50 de células neoplásicas e foram calculados com 72 horas de tratamento. Os valores de IS para as linhagens B16F10 e HRT18 em 72 horas de tratamento calculados com os IC50 obtidos pelos resultados do VN foram 0,62 e 0,55 respectivamente, e para os resultados de IC50 obtidos com o MTT foram 0,75 e 0,57 respectivamente, indicando que o eufol não apresentou seletividade para as linhagens neoplásicas.

Pesquisas com outras linhagens celulares também apontam para a falta de seletividade para células neoplásicas do eufol. Em culturas de células de glioblastoma, das 12 linhagens avaliadas somente duas apresentaram valores maiores que 2,0 para o índice de seletividade quando comparadas com astrócitos humanos, sendo a linhagem GAMG e SF188 com valores de 2,3 e 3,3 respectivamente (SILVA et al., 2019).

No entanto, a literatura mostra que os extratos de *E. umbellata* apresentam maior seletividade que seu terpeno isolado eufol. Luz et al. (2016) ao determinarem o índice de seletividade para fração hexano de látex de *E. umbellata* em culturas de células Jurkat comparadas com linfócitos, obtiveram um índice de 4,3 mostrando a seletividade da fração hexano. Já Cruz (2017) avaliando a subfração diclorometano, obteve com a mesma linhagem quando comparada a linfócitos, índice de seletividade de 6,9 e quando comparada a monócitos, índice de 10,39, mostrando que o fracionamento da fração hexano aumenta a seletividade da matriz vegetal, principalmente por reduzir a toxicidade ao linfócito.

Este fato pode ser atribuído aos extratos e frações serem compostos por misturas complexas. Desse modo, as substâncias que possuem atividade biológica podem estar presentes em concentrações menores, o que pode melhorar sua seletividade quando comparada a sua avaliação isoladamente.

Apesar disso, o desenvolvimento de nanocarreadores associados ao eufol podem melhorar essa seletividade. A utilização de nanopartículas associada às terapias do câncer tem possibilitado uma maior seletividade das drogas, permitindo que o tratamento seja direcionado para a destruição das células doentes sem prejudicar as células saudáveis, desenvolvendo assim, um sistema que seleciona as células que devem ser destruídas (HE; TANG, 2018).

5.2.5 Ensaios morfológicos

A análise morfológica permite, por meio dos estudos das alterações morfológicas, dar indícios dos mecanismos de morte celular. Tem aplicabilidade para células em suspensão e aderente e pode ser realizada sob microscopia fluorescente e óptica (VAN DER MEER et al., 2010).

A morte celular pode ocorrer em contextos fisiopatológicos distintos, e dentre os mecanismos existentes, a necrose e apoptose distinguem-se molecular, bioquímica e morfológicamente, dependendo da duração ou da intensidade do estresse ao qual a célula é submetida (MARTIN; HENRY, 2013).

Por um lado, no cenário de lesões maciças, hipóxico ou tóxico, as células podem atingir um estado de esgotamento celular e de energia em que perdem a capacidade de manter as funções homeostáticas básicas, resultando em necrose, uma perda autolítica passiva e descontrolada da integridade celular (SCHWABE; LUEDDE, 2016). Morfológicamente, as células que sofrem necrose tipicamente mostram aumento do volume celular, desorganização do citoplasma, rompimento da membrana plasmática e organelas sem o quadro de picnose (uma redução do volume celular e nuclear) observada na condensação da cromatina na apoptose, com consequente indução de reação inflamatória local (VAN DER MEER et al., 2010).

Por outro lado, a apoptose é caracterizada por uma forma ordenada e regulada de morte celular, através de um programa suicida específico, que exerce apenas efeitos mínimos nas células circundantes e, portanto, não perturba a homeostase do tecido ou o desenvolvimento de órgãos (MARTIN; HENRY, 2013). Morfológicamente, a apoptose é caracterizada por encolhimento celular, citoplasma denso com organelas fortemente compactadas e picnose causada pela condensação característica e fragmentação da cromatina além de prolongamentos chamados *blebs* (ELMORE, 2007).

A maioria das alterações morfológicas observadas é causada por uma série de cisteíno proteases, chamadas caspases, que são ativadas especificamente em células em apoptose. A ativação das caspases promove o aparecimento das alterações celulares que caracterizam a apoptose. Estas alterações são comuns a todas as células em apoptose, independentemente do agente indutor do processo (MARTIN; HENRY, 2013).

Neste trabalho, a visualização da morfologia das células foi realizada em microscópio óptico invertido, á fresco e com auxílio de corantes hematológicos. Os resultados á fresco mostraram redução da densidade celular a partir de 58,7µM para a linhagem 3T3 e B16F10 e a partir de 176,1µM para a linhagem HRT18. Na concentração de 234,7µM pôde-se observar

ainda debris, arredondamento celular e fragmentos apoptóticos em todas as linhagens (TABELA 6).

TABELA 6: ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS LINHAGENS 3T3, B16F10 E HRT18 APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO COM EUFOL.

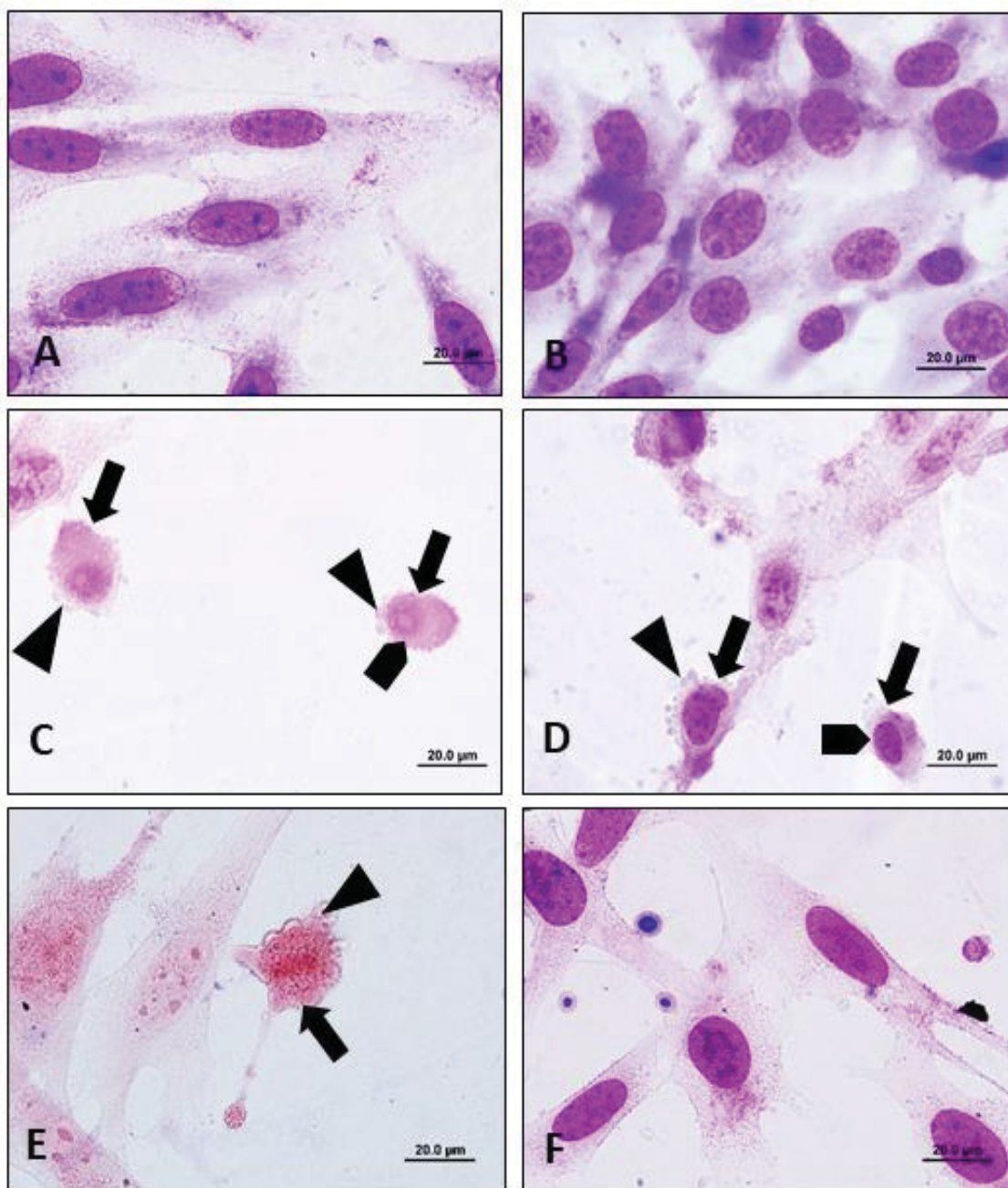
Linhagem	Concentração de Eufol (uM)					
	7,3	14,6	29,3	58,7	176,1	234,7
3T3	Normal	Normal	Normal	Redução da densidade celular	Redução da densidade celular	Debris Arredondamento Fragmentos apoptóticos
B16F10	Normal	Normal	Normal	Redução da densidade celular	Redução da densidade celular	Debris Arredondamento Fragmentos apoptóticos
HRT18	Normal	Normal	Normal	Normal	Redução da densidade celular	Debris Arredondamento Fragmentos apoptóticos

NOTA: Visualização à fresco das células em microscópio óptico invertido, análise em aumento de 200 e 400x.
FONTE: A autora, 2019.

Na análise à fresco, a citotoxicidade induzida pelo eufol é visualmente percebida nas linhagens 3T3, B16F10 e HRT18, com a intensa redução da densidade celular e formação de debris celulares, além disso, pode-se perceber indícios de morte celular por apoptose devido ao arredondamento celular e presença de corpos apoptóticos. No entanto a visualização à fresco apresenta limitações, como o aumento máximo de 400x, sendo necessário a visualização com corantes para precisar as alterações celulares (KWAN et al., 2016).

Os resultados morfológicos utilizando os corantes hematológicos May Grunwald e Giemsa para as linhagens HRT18, B16F10 e fibroblastos 3T3, mostraram que em 72 horas de tratamento houve arredondamento celular, formação de *blebs* e condensação de cromatina (FIGURAS 25, 26 e 27). Para a linhagem HRT18 ainda foi possível observar estruturas celulares diminutas com núcleo e citoplasma com aspecto de corpos apoptóticos. O tratamento nas concentrações de 234,7, 176,1 e 58,7 μ M reduziu intensamente o número de células em todas as linhagens testadas e na menor concentração avaliada (29,3 μ M) somente a linhagem B16F10 apresentou alterações celulares.

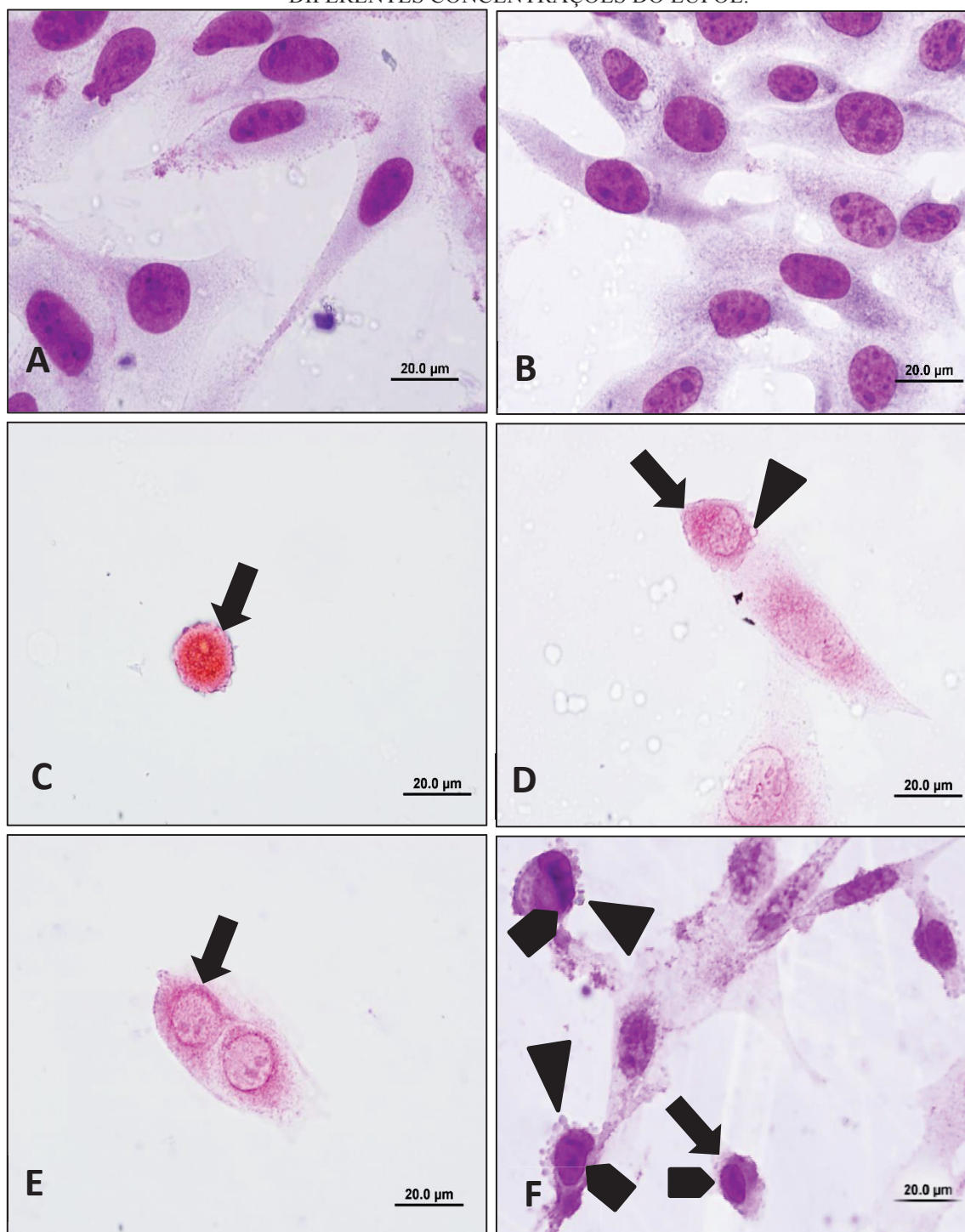
FIGURA 25: MORFOLOGIA CELULAR DA LINHAGEM 3T3 APÓS INCUBAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EUFOL.



NOTA: Células visualizadas com corantes hematológicos. A – Controle: células incubadas apenas com o meio de cultivo celular, RPMI. B – células incubadas com o veículo, 0,5% de DMSO. C, D, E e F – Células tratadas respectivamente com 234,7, 176,1, 58,7 e 29,3 μM de Eufol por 72 horas. Alterações morfológicas: condensação de cromatina \blacksquare , arredondamento celular \blacktriangleup , formação de blebs \blacktriangledown . Aumento de 1000 x. Barra = 20 μm

FONTE: A autora, 2019.

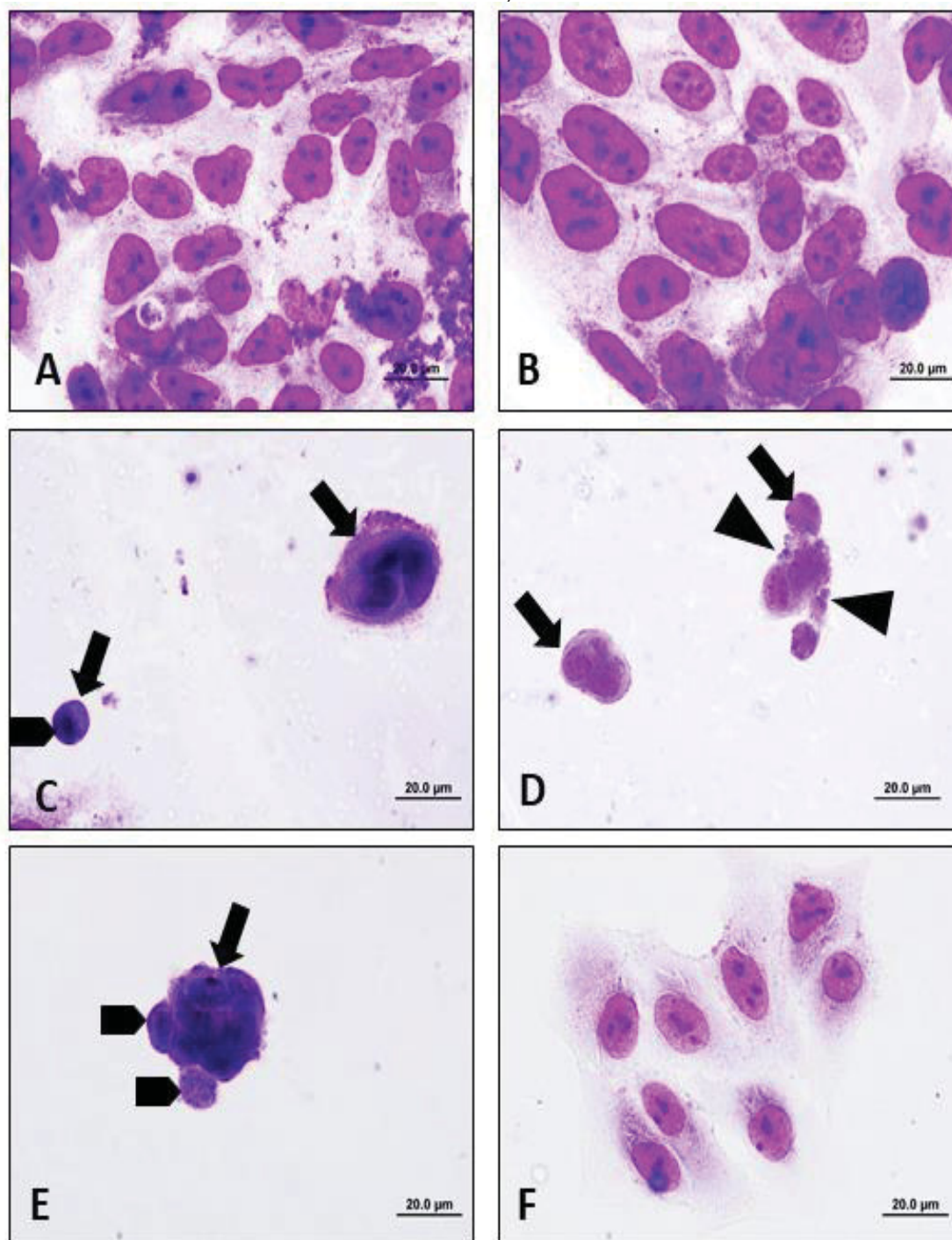
FIGURA 26: MORFOLOGIA CELULAR DA LINHAGEM B16F10 APÓS INCUBAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EUFOL.



NOTA: Células visualizadas com corantes hematológicos. A – Controle: células incubadas apenas com o meio de cultivo celular, RPMI. B – células incubadas com o veículo, 0,5% de DMSO. C, D, E e F – Células tratadas respectivamente com 234,7, 176,1, 58,7 e 29,3 μM de Eufol por 72 horas. Alterações morfológicas: condensação de cromatina \blacksquare , arredondamento celular \blacktriangledup , formação de blebs \blacktriangle . Aumento de 1000 x. Barra = 20 μm .

FONTE: A autora, 2019.

FIGURA 27: MORFOLOGIA CELULAR DA LINHAGEM HRT18 APÓS INCUBAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EUFOL.



NOTA: Células visualizadas com corantes hematológicos. A – Controle: células incubadas apenas com o meio de cultivo celular, RPMI. B – células incubadas com o veículo, 0,5% de DMSO. C, D, E e F – Células tratadas respectivamente com 234,7, 176,1, 58,7 e 29,3 μM de Eufol por 72 horas. Alterações morfológicas: condensação de cromatina \blacksquare , arredondamento celular \blacktriangleup , estruturas celulares diminutas com núcleo e citoplasma com aspecto de corpos apoptóticos \blacktriangle . Aumento de 1000x. Barra = 20 μm

FONTE: A autora, 2019

Conforme observado na visualização à fresco das células, a morte celular induzida pelo eufol também apresentou características apoptóticas quando visualizadas com a coloração hematológica.

O mecanismo de ação de citotoxicidade demonstrados na literatura para a família Euphorbiaceae está associado à capacidade destas plantas de induzirem apoptose celular, como demonstraram Lima et al. (2018) com o óleo essencial de *Croton matourensis* Aublet que foi capaz de causar externalização da fosfatidilserina e fragmentação do DNA sem perda da integridade da membrana celular nas células de hepatocarcinoma (DE LIMA et al., 2018).

Outro trabalho demonstrou ainda que o extrato hidroalcoólico das partes aéreas da espécie *Euphorbia szovitsii* Fischer & Meyer pode induzir apoptose e parada do ciclo em linhagem celular de câncer de mama (ASADI-SAMANI et al., 2019). Além disso, o fator Euphorbia L1 (EFL1), um diterpenoide extraído da espécie *Euphorbia lathyris* Linnaeus, induziu ativação de apoptose mediada por mitocôndrias em células de câncer gástrico (ZHU et al., 2019).

Na espécie *E. umbellata* a apoptose também é descrita na literatura como principal mecanismo de morte celular. Luz et al. (2016) perceberam morte celular por apoptose avaliando o extrato hexânico do látex de *E. umbellata* em cultura de células Jurkat e Kanunfre et al. (2017), avaliando a mesma linhagem de células, também observaram efeitos apoptóticos na fração clorofórmio da casca de *E. umbellata*, ambos os trabalhos utilizando metodologias de análise morfológica das células.

Da mesma forma, Mota, Benfica e Valadares (2012) observaram morte celular com características de apoptose em células ascíticas de tumor de Ehrlich tratadas com extrato etanólico de folhas de *S. umbellatum* (sinonímia *E. umbellata*). Além disso, os pesquisadores descreveram que os resultados indicam aumento no potencial de membrana mitocondrial, a externalização da fosfatidilserina e a ativação da caspase, eventos bioquímicos que demonstram a indução de apoptose (DA MOTA et al., 2012).

Para o terpeno eufol somente dois trabalhos relatam mecanismos de morte celular. Em conformação com os resultados encontrados nesta pesquisa, Lin et al. (2012) avaliando o efeito do eufol em culturas de câncer gástrico CNS, CS12 e MKN45, através de mecanismos bioquímicos (dosagem de caspases e anexina), sugerem que a indução de morte celular foi via apoptose pela modulação da sinalização de ERK (quinase controlada pela sinalização extracelular). Já estudo recente realizado por Silva et al. (2018a) avaliando 12 linhagens de glioblastoma mostra que a morte celular induzida pelo eufol foi devido a autofagia.

A autofagia é caracterizada pela formação de vesículas específicas “autofagossomos”, que envolvem proteínas desnaturadas, agregados proteicos danificados e organelas celulares desintegradas. O conteúdo dos autofagossomos é em seguida entregue aos lisossomos para degradação enzimática (GUAMAN-ORTIZ; ORELLANA; RATOVIISKI, 2017). Apesar de diferenças significativas entre apoptose e autofagia, sua regulação é inseparável e os mesmos reguladores às vezes podem controlar tanto a apoptose quanto a autofagia (GAO et al., 2016). Sendo assim, as duas vias (apoptose e autofagia) podem estar associadas aos mecanismos de morte celular induzidos pelo eufol, no entanto, estudos mais detalhados são necessários para melhor elucidação destes mecanismos.

Apesar de o eufol ter demonstrado potenciais efeitos citotóxicos contra as linhagens tumorais B16F10 e HRT18, a linhagem B16F10 foi selecionada para proceder à avaliação de mecanismos envolvidos na morte celular devido a sua maior responsividade ao tratamento apresentando IC50 mais baixos que a HRT18.

5.2.5 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica capaz de quantificar organelas e componentes celulares, dentre eles, o DNA. O ensaio de avaliação do ciclo celular é realizado após o tratamento das células com iodeto de propídeo, um composto fluorescente que se intercala no DNA, e quando analisado por citometria de fluxo, emite fluorescência proporcional ao conteúdo genético presente nas fases do ciclo celular (SCHIFINO-WITTMANN, 2001).

Uma vez que a divisão celular descontrolada e rápida é uma característica do câncer, desvendar os mecanismos moleculares subjacentes à mitose é essencial para entender como vários compostos naturais podem funcionar como inibidores da progressão do ciclo celular (DOMINGUEZ-BRAUER et al., 2015). Além disso, muitos compostos naturais que interferem no ciclo celular têm se mostrado eficazes para matar células cancerígenas *in vitro*, *in vivo* e em ambientes clínicos. Entre os mais estudados estão compostos naturais incluindo taxanos (por exemplo, taxol, paclitaxel, docetaxel) e alcaloides de vinca (por exemplo vincristina, vinblastina), cujos alvos validados são os microtúbulos fusiformes (BAILON-MOSCOSO et al., 2017). Nesta análise verificou-se se a substância testada tem a capacidade de provocar alterações no ciclo celular.

As células B16F10 foram incubadas por 24 horas com eufol e o conteúdo de DNA foi analisado nas diferentes fases do ciclo celular. O percentual de células em cada fase foi comparado com os grupos controle (TABELA 7). As células B16F10 não apresentaram

diferença estatística quando comparadas ao grupo controle. O quimioterápico utilizado como controle positivo Doxorrubicina provocou um aumento no número de células na fase G2/M (FIGURA 28).

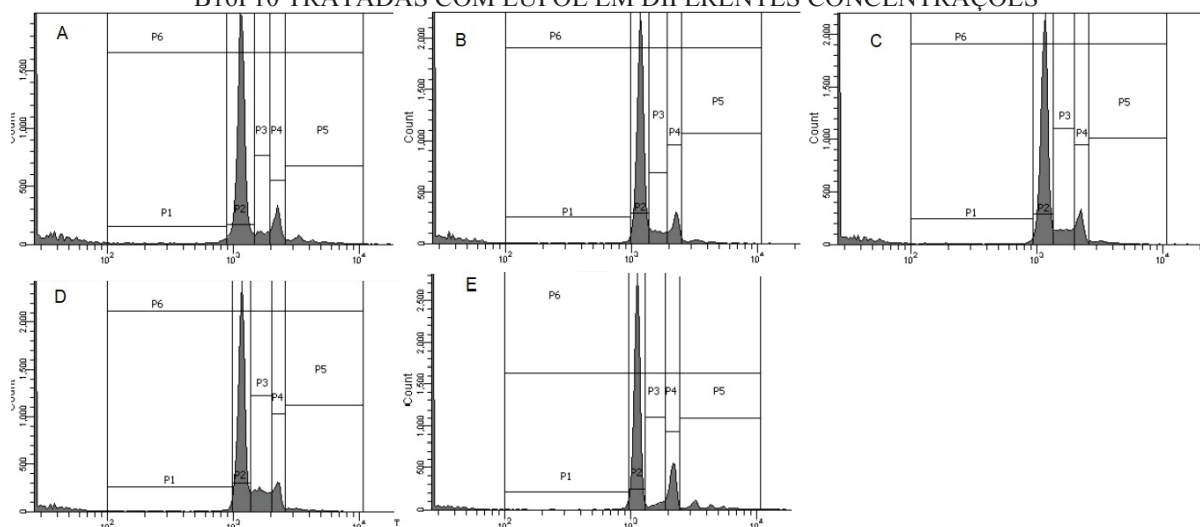
TABELA 7: DISTRIBUIÇÃO DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS B16F10 APÓS TRATAMENTO COM EUFOL.

AMOSTRAS	SUB G0	G0/G1	S	G2/M
Controle	$3,58 \pm 1,13$	$72,44 \pm 1,53$	$7,38 \pm 2,03$	$16,61 \pm 2,43$
Eufol 8,7 μM	$1,60 \pm 0,54$	$72,60 \pm 1,52$	$10,05 \pm 1,47$	$15,75 \pm 1,39$
Eufol 17,5 μM	$3,50 \pm 1,30$	$71,17 \pm 1,74$	$10,68 \pm 0,42$	$14,65 \pm 0,87$
Eufol 35,2 μM	$1,48 \pm 0,31$	$70,16 \pm 2,10$	$14,09 \pm 3,11$	$14,28 \pm 1,64$
Doxorrubicina	$0,85 \pm 0,11$	$72,58 \pm 0,82$	$3,89 \pm 1,02$	$22,68 \pm 1,58^*$

NOTA: Controle negativo realizado com o veículo (DMSO 0,5%). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão da média, utilizando análise de variância ANOVA de uma via seguido do pós teste de tukey, com significância de $*p < 0,05$ comparado com o controle.

FONTE: A autora, 2019.

FIGURA 28: HISTOGRAMA DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS CÉLULAS B16F10 TRATADAS COM EUFOL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



NOTA: P1, P2, P3 e P4 representam as fases do ciclo celular correspondendo respectivamente a Sub G0, G0/G1, S e G2/M. (A) Controle negativo com veículo (DMSO 0,5%), (B) Eufol 8,7 μ M, (C) Eufol 17,5 μ M, (D) Eufol 35,2 μ M, (E) Doxorrubicina

FONTE: A autora, 2019.

Muitos produtos naturais eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos. No entanto, um segundo grupo de agentes, denominados fármacos ciclo-celular não específicos, tem a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso (ALMEIDA et al., 2005).

Neste trabalho não foram observadas diferenças na quantidade de material genético detectado nas fases do ciclo celular das células B16F10 quando comparadas as diferentes concentrações de eufol ao controle, portanto, pode-se afirmar que o eufol apresenta citotoxicidade ciclo-celular não específica.

Apesar disso, o gênero *Euphorbia* apresenta esta característica descrita na literatura para algumas espécies em outras linhagens tumorais. O extrato metanólico da espécie *Euphorbia hirta* Linnaeus exibiu características morfológicas marcadas de apoptose na microscopia óptica e na microscopia com auxílio da coloração de laranja de acridina e iodeto de propídeo em células de câncer de mama (MCF7) e o estudo através da citometria de fluxo confirmou que o extrato de *E. hirta* induziu apoptose. Além disso, o tratamento com *E. hirta* resultou no acúmulo de células nas fases S e G2/M (KWAN et al., 2016). Já o extrato hidroalcoólico da espécie *E. szovitsii* foi capaz de aumentar a porcentagem de células na fase G1 enquanto uma diminuição foi observada na população de células na fase S também em células de câncer de mama (ASADI-SAMANI et al., 2019).

Da mesma forma, terpenos isolados de espécies do gênero *Euphorbia* induzem parada de ciclo celular e apoptose em células de linhagens de câncer. O diterpeno tetrahydroingenol isolado de *Euphorbia erythradenia* Boissi'er, 7,13-diacetil-5-angeloil-20-nicotinil-3-propionil-1,2,6,7-tetrahydroingenol (DANPT), foi testado para avaliar mecanismos moleculares de sua atividade anticâncer em duas linhas celulares de câncer de melanoma humano, A375 e HMCB. DANPT foi considerado citotóxico contra células A375 e HMCB com valor de IC₅₀ de 15,37 μ M e 15,62 μ M, respectivamente. A análise por citometria de fluxo mostrou também que o DANPT promove parada das células A375 e HMCB na fase G2/M e induz apoptose de maneira dependente da dose (FALLAHIAN et al., 2017).

No entanto, a literatura sobre a ação do eufol no ciclo celular é escassa e controversa. Conforme resultado encontrado neste trabalho, Silva et al. (2018b) não observaram parada do ciclo celular avaliando culturas de células de glioma GAMG e U373. Por outro lado, Wang et al. (2013) mostram que o eufol induz parada do ciclo celular na fase G1 em culturas de células de câncer de mama T47D após 48 horas de incubação com uma concentração de 300 μ M.

Apesar disso, ambos os trabalhos não observaram diferença do grupo tratado com eufol e o grupo controle na fase sub G0. O aumento de eventos nessa fase caracteriza a presença de fragmentos de DNA, sendo esta, uma das características de morte celular por apoptose (BECCENERI, 2015).

5.2.6 Análise do potencial transmembrânico de mitocôndria (MTP)

O corante rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, pode ser usado para elucidação de mecanismos de ação de morte celular. Ele é sequestrado para dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Assim, células viáveis emitem alta fluorescência verde devido a acumulação eletroforética nas mitocôndrias, enquanto as mitocôndrias das células apoptóticas tem menor afinidade pelo corante gerando eventos que emitem menor fluorescência. Ele é empregado para realizar a medição do potencial de membrana orientado pela respiração (BARACCA et al., 2003).

Os resultados obtidos nesta análise estão apresentados na TABELA 8. As células B16F10 incubadas por 24 horas com eufol não apresentaram diferença estatística quando comparadas ao grupo controle. Mesmo na maior concentração testada o histograma das células tratadas com eufol mostra a mesma característica do controle negativo (FIGURA 29).

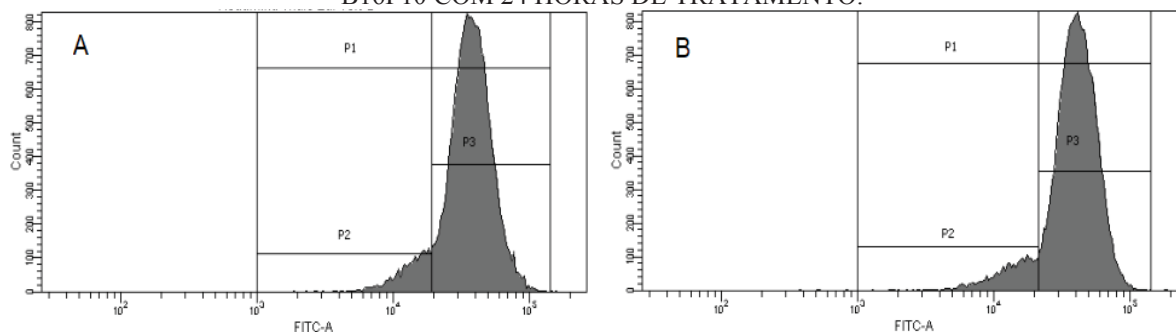
TABELA 8: PORCENTAGEM DE DESPOLARIZAÇÃO MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS B16F10 APÓS TRATAMENTO DE 24 HORAS COM EUFOL.

Tratamento	% de polarização mitocondrial	
	Polarizado	Despolarizado
Controle	96,59 ± 1,64	1,53 ± 1,07
Eufol 34,4 µM	97,51 ± 1,98	1,25 ± 1,56
Eufol 93,8 µM	96,21 ± 1,54	1,98 ± 1,34

NOTA: Controle negativo com veículo (DMSO 0,5%). Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média, utilizando análise de variância ANOVA de uma via seguido do pós teste de tukey, com significância de *p<0,05.

FONTE: A autora, 2019.

FIGURA 29: EFEITO DO EUFOL SOBRE A DESPOLARIZAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS DAS CÉLULAS B16F10 COM 24 HORAS DE TRATAMENTO.



NOTA: A- Controle negativo com veículo (DMSO 0,5%), B- Eufol 40 µM

FONTE: A autora, 2019.

O processo apoptótico envolve a participação ativa das células afetadas na cascata de autodestruição que culmina em degradação do DNA via ativação de endonucleases,

desintegração nuclear e formação de “corpos apoptóticos”. Estes corpos apoptóticos são rapidamente retirados do tecido por macrófagos, esta sinalização ocorre devido a translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana “marcando” as células que deverão ser fagocitadas (SCHWABE; LUEDDE, 2016).

Este processo pode ser desencadeado por meio de duas vias principais, a extrínseca (via receptor na membrana) e a intrínseca (via alteração na mitocôndria). A via extrínseca é ativada por estímulos extracelulares de estresse e caracteriza-se pela ligação de ligantes a receptores específicos na superfície celular, conhecidos como “receptores de morte” (ANAZETTI; MELO, 2007).

Já a via intrínseca de apoptose inicia-se na mitocôndria e é ativada por estresses intra ou extracelulares, que geram sinais responsáveis por deflagrar o processo apoptótico. Quando estes sinais alcançam a mitocôndria, induzem o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, assim como o colapso do potencial da membrana mitocondrial interna e, simultaneamente, a passagem de água para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela (LUCHS; PANTALEÃO, 2010).

Mota, Benfica e Valadares (2012) observaram no extrato etanólico das folhas da espécie *S. umbellatum* (sinonímia *E. umbellata*) indução de apoptose em células K-562 pela via mitocondrial com aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio, seguido de uma hiperpolarização mitocondrial e ativação de caspase 9 (específica para via intrínseca da apoptose). Da mesma forma, o EFL1, diterpenoide extraído da espécie *E. lathyris*, aumentou positivamente a expressão de caspase-9 e caspase-3 por estímulo mitocondrial e diminuiu a quantidade de proteína anti-apoptótica Bcl-2 significativamente, indicando que o EFL1 ativou a via de apoptose mediada por mitocôndrias em células de câncer gástrico (ZHU et al., 2019).



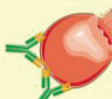
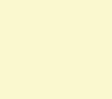
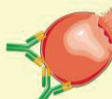






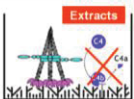

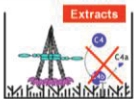
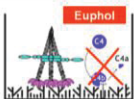










No entanto não foram observadas diferenças nos potenciais mitocondriais das células B16F10 quando tratadas com eufol por 24 horas nas concentrações de 34,4 e 93,8 μM . Esse resultado sugere que a morte provocada pelo eufol nas células B16F10 pode estar relacionado a via extrínseca da apoptose, visto que não houve alteração do potencial mitocondrial ou que outros tipos de morte celular podem estar associados.

Ensaio mais específicos para identificação de apoptose, como a marcação de células por anexina V, podem ser realizados para melhor elucidar o mecanismo de morte celular. A anexina V se liga à fosfatidilserina externalizadas por células apoptóticas para sinalizar as células que deverão ser fagocitadas (ANAZETTI; MELO, 2007). Além da anexina, ensaios mais específicos de ativação das vias de apoptose, como caspases específicas para cada via,

também podem ser realizados, bem como, a avaliação de outras linhagens celulares tratadas com eufol para melhor elucidação desses mecanismos.

Assim, dentre as atividades biológicas exploradas neste trabalho, atribui-se aos extratos de *E. umbellata* atividade moduladora do SC. Todos os extratos de *E. umbellata* apresentaram efeito inibitório sobre a ativação da VA, enquanto na VC os extratos obtidos com metanol e acetato de etila apresentaram inibição e o extrato clorofórmio ativou essa via. Na VL, os extratos obtidos com os solventes acetato de etila e hexano inibiram sua ativação. Todos os extratos foram capazes de inibir a quimiotaxia em neutrófilos induzida por caseína, e, de acordo com a literatura, importante atividade citotóxica é atribuída ao extrato hexânico em cultura de células. Da mesma forma, o triterpeno isolado eufol apresentou atividade moduladora do SC, inibindo a VA e VL e ativando a VC, apresentou inibição da quimiotaxia de neutrófilos induzida por caseína e citotoxicidade não seletiva para linhagens tumorais com indícios morfológicos de morte por apoptose mas que precisam de maior elucidação (FIGURA 30).

FIGURA 30: ATIVIDADES BIOLÓGICAS PROPOSTAS PARA O EXTRATOS DE *E. umbellata* E PARA O EUFOL

Efeitos biológicos	Extratos do látex de <i>Euphorbia umbellata</i>				Substância isolada
	Metanol	Acetato de etila	Clorofórmio	Hexano	Eufol
Via Clássica	 Inibição	 Inibição	 Ativação	 Sem efeito	 Ativação
Via Alternativa	 Inibição	 Inibição	 Inibição	 Inibição	 Inibição
Via das lectinas	 Sem efeito	 Inibição	 Sem efeito	 Inibição	 Inibição
Quimiotaxia de neutrófilos	 Inibição	 Inibição	 Inibição	 Inibição	 Inibição
Citotoxicidade	 Sem efeito	 Sem efeito	 Baixa	 Alta	 Baixa

NOTA: Citotoxicidade dos extratos do látex de *E. umbellata* de acordo com LUZ et al. (2016).

FONTE: A autora, 2019.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam as aplicações etnofarmacológicas de *E. umbellata*. Os extratos obtidos com os solventes metanol, acetato de etila e hexano foram capazes de inibir as VC, VA e VL do sistema complemento podendo diminuir efeitos inflamatórios pronunciados e ser utilizados em doenças inflamatórias. Já o extrato clorofórmio apresentou inibição da VA e ativação da VC e o terpeno isolado eufol promoveu ao mesmo tempo a inibição da ativação da VA e VL, e ativação da VC. A ativação controlada da VC pode contribuir com a melhora da resposta tumoral.

Além disso, todos os extratos do látex de *E. umbellata* e o terpeno eufol foram capazes de inibir a quimiotaxia de neutrófilos corroborando sua utilização em condições inflamatórias acentuadas.

Os ensaios de citotoxicidade permitiram verificar a ação do eufol nas linhagens celulares HRT18, B16F10 e 3T3 por ambas as metodologias utilizadas, MTT e VN. No entanto, a metodologia do VN foi mais sensível para a detecção da citotoxicidade. Apesar disso, o eufol não apresentou seletividade para as duas linhagens de células de câncer testadas, B16F10 e HRT18, apresentando baixos índices de seletividade e os valores de IC₅₀ obtidos nas três linhagens em estudo foram maiores do que os recomendados pelo programa de triagem do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos.

Os ensaios de mecanismo de morte celular mostraram indícios de morte por apoptose quando avaliadas as morfologias das células por microscopia óptica e com corantes hematológicos, no entanto não houve alteração no ciclo celular nem no potencial transmembrânico de mitocôndria, sugerindo-se que haja mais de um mecanismo de morte celular induzida pelo eufol.

Estes dados sugerem que os extratos aqui avaliados podem ter uma aplicação no tratamento de doenças inflamatórias e no tratamento adjuvante do câncer. Entretanto, estudos mais aprofundados sobre a constituição dos extratos de *E. umbellata* devem ser realizados e podem fornecer subsídios para ajudar na elucidação dos mecanismos de ação e das atividades biológicas propostas para essa espécie.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro.
- AFSHAR-KHARGHAN, V. The role of the complement system in cancer Find the latest version : **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 780–789, 2017.
- AGARWAL, G.; CARCACHE, P. J. B.; ADDO, E. M.; KINGHORN, A. D. Current status and contemporary approaches to the discovery of antitumor agents from higher plants. **Biotechnology Advances**, n. July 2018, p. 0–1, 2019.
- AJONA, D.; ORTIZ-ESPINOSA, S.; PIO, R. Complement anaphylatoxins C3a and C5a: Emerging roles in cancer progression and treatment. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 85, p. 153–163, 2019.
- AJONA, D.; ORTIZ-ESPINOSA, S.; PIO, R.; LECANDA, F. **Complement in metastasis: A comp in the camp**, 2019.
- ALBAN, S.; CLASSEN, B.; BRUNNER, G.; BLASCHEK, W. Differentiation Between the Complement Modulating Echinacea purpurea and Heparin. **Planta Medica**, p. 1118–1124, 2002.
- ALEGRETTI, A. P.; MUCENIC, T.; CARLOS, J.; BRENOL, T.; XAVIER, R. M. O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55 / CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. v. 49, n. 51, 2009.
- ALEGRETTI, A. P.; SCHNEIDER, L.; PICCOLI, A. K.; MONTICIELO, O. A.; LORA, P. S.; BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M. H. Diminished expression of complement regulatory proteins on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus patients. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.
- ALMEIDA, V. L. De; LEITÃO, A.; REINA, L. del C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- ANAZETTI, M. C. .; MELO, P. S. Apoptosis Cell Death : biochemistry and molecular aspects. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37–58, 2007.
- ANDERSEN, Ø. M.; JORDHEIM, M.; BYAMUKAMA, R.; MBABAZI, A.; OGWENG, G.; SKAAR, I.; KIREMIRE, B. Phytochemistry Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). v. 71, p. 1558–1563, 2010.
- ASADI-SAMANI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; LORIGOOINI, Z.; SHIRZAD, H. The effect of euphorbia szovitsii fisch. & C.A.Mey extract on the viability and the proliferation of MDA-MB-231 cell line. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 1, p. 1–8, 2019.
- ASSAF, A. M.; HADDADIN, R. N.; ALDOURI, N. A.; ALABBASSI, R.; MASHALLAH, S.; MOHAMMAD, M.; BUSTANJI, Y. Anti-cancer, anti-inflammatory and anti-microbial

activities of plant extracts used against hematological tumors in traditional medicine of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 3, p. 728–736, 2013.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.; LINDER, T.; WAWROSC, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products : A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.

AYESH, B. M.; ABED, A. A.; FARIS, D. M. In vitro inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L. and *Thymus vulgaris* L. extracts. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 612, p. 1–6, 2014.

AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-inflammatory activity of natural products. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1–19, 2016.

BADGUJAR, S. B. Evaluation of hemostatic activity of latex from three Euphorbiaceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 733–739, 2014.

BAGAVATHI, R.; SORG, B. .; HECKER, E. E. Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. **Planta Medica**, v. 54, p. 506–510, 1998.

BAILON-MOSCOSO, N.; CEVALLOS-SOLORZANO, G.; ROMERO-BENAVIDES, J.; RAMIREZ ORELLANA, M. Natural Compounds as Modulators of Cell Cycle Arrest: Application for Anticancer Chemotherapies. **Current Genomics**, v. 18, n. 2, p. 106–131, 2017.

BANIADAM, S.; REZA, M.; GHANNADIAN, M. Cycloartane Triterpenoids from *Euphorbia macrostegia* with their Cytotoxicity against MDA-MB48 and MCF-7 Cancer Cell Lines. v. 13, n. October 2012, p. 135–141, 2014.

BARACCA, A.; SGARBI, G.; SOLAINI, G.; LENAZ, G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: Evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1606, n. 1–3, p. 137–146, 2003.

BECCENERI, A. B. Mecanismo de ação da cedrelona na morte celular programada de células de câncer de mama Mecanismo de ação da cedrelona na morte celular programada de células de câncer de mama. **Dissertação de mestrado**. 2015.

BELTRAME, M. H.; CATARINO, S. J.; GOELDNER, I.; BOLDT, A. B. W.; DE MESSIAS-REASON, I. J. The Lectin Pathway of Complement and Rheumatic Heart Disease. **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, n. January, p. 1–14, 2015.

BENENCIA, F.; COURRÈGES, M. C.; NORES, M. M.; COULOMBIÉ, F. C. Immunomodulatory activities of *Cedrela tubiflora* leaf aqueous extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 3, p. 133–139, 1995.

BERRAONDO, P.; MINUTE, L.; AJONA, D.; CORRALES, L.; MELERO, I.; PIO, R. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 290–306, 2016.

BORGES, R.; NASCIMENTO, M. V. M.; DE CARVALHO, A. A. V.; VALADARES, M. C.; DE PAULA, J. R.; COSTA, E. A.; DA CUNHA, L. C. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract from *Synadenium umbellatum* pax. (Euphorbiaceae) leaves and its fractions. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

BRASIL. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Ministério da Saúde. Brasília. 2016.

BRUGGISSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULLBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 445–448, 2002.

CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 233–247, 2017.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 91, p. 1–7, 2019.

CAMPOS, A.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; LONGATO, G. B.; ZERMIANI, T.; RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E.; PANDIELLA, A.; CECHINEL FILHO, V. Antiproliferative Effect of *Synadenium grantii* Hook f. stems (Euphorbiaceae) and a Rare Phorbol Diterpene Ester. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 666–671, 2016. a.

CAMPOS, S. C.; SILVA, C. G.; CAMPANA, P. R. V.; ALMEIDA, V. L. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 373–382, 2016. b.

CENDALES, D. R. M.; SUAREZ, L. E. C. Compuestos citotóxicos de origem vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). **Rev Colomb Cancerol.**, n. xx, 2016.

CHEN, C. L.; CHEN, Y. P.; LIN, M. W.; HUANG, Y. Bin; CHANG, F. R.; DUH, T. H.; WU, D. C.; WU, W. C.; KAO, Y. C.; YANG, P. H. Euphol from *Euphorbia tirucalli* negatively modulates TGF- β responsiveness via TGF- β receptor segregation inside membrane rafts. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–22, 2015.

CIMANGA, K.; DE BRUYNE, T.; VAN POEL, B.; MA, Y.; CLAEYS, M.; PIETERS, L.; KAMBU, K.; TONA, L.; BAKANA, P.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. J. Complement-modulating properties of a kaempferol 7-O-rhamnosylsophoroside from the leaves of *Morinda morindoides*. **Planta medica**, v. 63, n. 3, p. 220–3, 1997.

COS, P.; HERMANS, H.; POEL, B. V.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; SINDAMBIWE, J. B.; BERGUE, D. V.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Complement modulating activity of Rwandan medicinal plants. **Phytomedicine**, v. 9, n. 1, p. 56–61, 2002.

COSTA, L. L. G.; DAVID, V. C.; PINTO, R. M. C.; MINOZZO, R. B.; KOZLOWSKI JUNIOR, V. A.; CAMPOS, L. A.; SILVA, R. Z.; BELTRAME, F. L. Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, p. 1070–1078, 2012.

COURTOIS, A.; SIMON-COLIN, C.; BOISSET, C.; BERTHOU, C.; DESLANDES, E.; GUEZENNEC, J.; BORDRON, A. Floridoside extracted from the red alga *Mastocarpus stellatus* is a potent activator of the classical complement pathway. **Marine Drugs**, v. 6, n. 3, p. 407–417, 2008.

CRUZ, L. S. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE SUBFRAÇÕES DO LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns E EUFOL. **Dissertação de mestrado**, p. 65, 2017.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, Â. A. S.; LINO, R. D. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2 A, p. 403–411, 2009.

DA MOTA, M. F.; BENFICA, P. L.; BATISTA, A. C.; MARTINS, F. S.; DE PAULA, J. R.; VALADARES, M. C. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 319–329, 2012.

DE LIMA, E. J. S. P.; ALVES, R. G.; D'ELIA, G. M. A.; DA ANUNCIAÇÃO, T. A.; SILVA, V. R.; SANTOS, L. de S.; SOARES, M. B. P.; CARDOZO, N. M. D.; COSTA, E. V.; DA SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; BEZERRA, D. P. Antitumor Effect of the Essential Oil from the Leaves of *Croton matourensis* Aubl. (Euphorbiaceae). **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 1–12, 2018.

DE OLIVEIRA, T. L.; MUNHOZ, A. C. M.; LEMES, B. M.; MINOZZO, B. R.; NEPEL, A.; BARISON, A.; FÁVERO, G. M.; CAMPAGNOLI, E. B.; BELTRAME, F. L. Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 263–269, 2013.

DOMINGUEZ-BRAUER, C.; THU, K. L.; MASON, J. M.; BLASER, H.; BRAY, M. R.; MAK, T. W. Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies, **Elsevier Inc.**, 2015.

DUTRA, R. C.; BICCA, M. A.; SEGAT, G. C.; SILVA, K. A. B. S.; MOTTA, E. M.; PIANOWSKI, L. F.; COSTA, R.; CALIXTO, J. B. The antinociceptive effects of the tetracyclic triterpene euphol in inflammatory and neuropathic pain models: The potential role of PKC ϵ . **Neuroscience**, v. 303, p. 126–137, 2015.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

DUTRA, R. C.; CLAUDINO, R. F.; BENTO, A. F.; MARCON, R.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Preventive and therapeutic euphol treatment attenuates experimental colitis in mice. **PloS one**, United States, v. 6, n. 11, p. e27122, 2011.

DUTRA, R. C.; SIMAO DA SILVA, K. A. B.; BENTO, A. F.; MARCON, R.; PASZCUK, A. F.; MEOTTI, F. C.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Euphol, a tetracyclic triterpene produces antinociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain: the involvement of cannabinoid system. **Neuropharmacology**, England, v. 63, n. 4, p. 593–605, 2012. a.

DUTRA, R. C.; SOUZA, P. R. C.; BENTO, A. F.; MARCOS, R.; BICCA, M. A.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: Evidence for the underlying mechanisms. **Biochemical pharmacology**, v. 83, p. 531–542, 2012. b.

EDWARDS, G.; DIERCKS, G. F. H.; SEELLEN, M. A. J.; HORVATH, B.; VAN DOORN, M. B. A.; DAMMAN, J. Complement Activation in Autoimmune Bullous Dermatoses: A Comprehensive Review. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. June, p. 1–8, 2019.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 4, n. 35, p. 495–516, 2007.

ERNST, M.; GRACE, O. M.; SASLIS-LAGOUDAKIS, C. H.; NILSSON, N.; TOFT, H.; RØNSTED, N. Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 90–101, 2015.

FALASCA, M.; RAIMONDI, C.; MAFFUCCI, T. Boyden chamber. In: WELLS, C. M.; PARSONS, M. (Eds.). **Cell Migration: Developmental Methods and Protocols**. 2. ed. p. 87–95.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC. 2010.

FALLAHIAN, F.; GHANADIAN, M.; AGHAEI, M.; ZAREI, S. M. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a new tetrahydroingenol diterpenoid from *Euphorbia erythradenia* Bioss. in melanoma cancer cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 86, p. 334–342, 2017.

FATOPE, M. O.; ZENG, L.; OHAYAGA, J. E.; SHI, G.; MCLAUGHLIN, J. L. Selectively cytotoxic diterpenes from *Euphorbia poissonii*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 1005–1008, 1996.

FELIU, D. A. Análise de terpenóides de espécies de *Croton* sect. Lamprocroton (Mull. Arg.) Pax (Euphorbiaceae). **Dissertação de Mestrado**. p.117, 2011.

FERNANDEZ-ARCHE, A.; SAENZ, M. T.; ARROYO, M.; DE LA PUERTA, R.; GARCIA, M. D. Topical anti-inflammatory effect of tirucallol, a triterpene isolated from *Euphorbia lactea* latex. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 146–148, 2010.

FRANÇA, E. De; VASCONCELLOS, A. G. Patentes De Fitoterápicos No Brasil: Uma Análise Do Andamento Dos Pedidos No Período De 1995-2017. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 35, n. 3, p. 329–359, 2019.

GAO, S.; SUN, D.; WANG, G.; ZHANG, J.; JIANG, Y.; LI, G.; ZHANG, K.; WANG, L.; HUANG, J.; CHEN, L. Growth inhibitory effect of paratocarpin E, a prenylated chalcone isolated from *Euphorbia humifusa* Wild., by induction of autophagy and apoptosis in human breast cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 121–128, 2016.

GOMEZ PEREZ, M.; FOURCADE, L.; MATEESCU, M. A.; PAQUIN, J. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. **Analytical Biochemistry**, v. 535, p. 43–46, 2017.

GRIGORE, A. Plant Phenolic Compounds as Immunomodulatory Agents. In: **Phenolic Compounds - Biological Activity**. p. 75–98.

GUAMAN-ORTIZ, L.; ORELLANA, M.; RATOVITSKI, E. Natural Compounds As Modulators of Non-apoptotic Cell Death in Cancer Cells. **Current Genomics**, v. 18, n. 2, p. 132–155, 2017.

HAJISHENGALLIS, G.; REIS, E. S.; MASTELLOS, D. C.; RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Novel mechanisms and functions of complement. **Nature Immunology**, v. 18, n. 12, p. 1288–1298, 2017.

HAUER, J. J.; SHAO, D.; ZHANG, Y.; NESTER, C. M.; SMITH, R. J. H. Factor B and C4B2a autoantibodies in C3 glomerulopathy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, p. 2–7, 2019.

HE, K.; TANG, M. Safety of novel liposomal drugs for cancer treatment: Advances and prospects. **Chemico-Biological Interactions**, v. 295, p. 13–19, 2018.

HE, Y.; ZHU, Q.; CHEN, M.; HUANG, Q.; WANG, W. The changing 50 % inhibitory concentration (IC 50) of cisplatin : a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer. v. 7, n. 43, 2016.

HERNÁNDEZ-LEMUS, E.; SOTO, M. E.; ROSALES, C. Editorial: Integrative Approaches to the Molecular Physiology of Inflammation. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. December, p. 1–3, 2018.

HUBER-LANG, M.; EKDAHL, K. N.; WIEGNER, R.; FROMELL, K.; NILSSON, B. Auxiliary activation of the complement system and its importance for the pathophysiology of clinical conditions. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, n. 1, p. 87–102, 2018.

ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 41–51, 2001.

IVANOVA, L.; UHLIG, S. A bioassay for the simultaneous measurement of metabolic activity, membrane integrity, and lysosomal activity in cell cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 379, n. 1, p. 16–19, 2008.

JANTAN, I.; AHMAD, W.; NASIR, S.; BUKHARI, A. Plant-derived immunomodulators : an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. v. 6, n. August, p. 1–18, 2015.

JOHANSSON, S.; GORANSSON, U.; LUIJENDIJK, T.; BACKLUND, A.; CLAESON, P.; BOHLIN, L. A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 1, p. 32–41, 2002.

KANUNFRE, C. C.; LEFFERS, T.; CRUZ, L. S.; LUZ, L. E. C.; CRISMA, A. R.; WANG, M.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. L. *Euphorbia umbellata* bark extracts – An in vitro cytotoxic study. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 2, p. 206–213, 2017.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.

KWAN, Y. P.; SAITO, T.; IBRAHIM, D.; AL-HASSAN, F. M. S.; EIN OON, C.; CHEN, Y.; JOTHY, S. L.; KANWAR, J. R.; SASIDHARAN, S. Evaluation of the cytotoxicity, cell-cycle arrest, and apoptotic induction by *Euphorbia hirta* in MCF-7 breast cancer cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 7, p. 1223–1236, 2016.

LAPPEGÅRD, K. T.; GARRED, P.; JONASSON, L.; ESPEVIK, T.; AUKRUST, P.; YNDESTAD, A.; MOLLNES, T. E.; HOVLAND, A. A vital role for complement in heart disease. **Molecular Immunology**, v. 61, n. 2, p. 126–134, 2014.

LI, G.; LOU, H. Strategies to diversify natural products for drug discovery. n. July 2017, p. 1255–1294, 2018.

LIN, M.-W.; LIN, A.-S.; WU, D.-C.; WANG, S. S. W.; CHANG, F.-R.; WU, Y.-C.; HUANG, Y.-B. Euphol from *Euphorbia tirucalli* selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, England, v. 50, n. 12, p. 4333–4339, 2012.

LUBBERS, R.; ESSEN, M. F. Van. Production of complement components by cells of the immune system. p. 183–194, 2017.

LUCHS, A.; PANTALEÃO, C. Apoptose e modelos in vivo para estudo das moléculas relacionadas a este fenômeno Apoptosis and in vivo models to study the molecules related to this phenomenon. **Apoptosis**, v. 8, p. 495–497, 2010.

LUNG, T.; RISCH, L.; RISCH, M.; SAKEM, B.; WÜRZNER, R.; NYDEGGER, U. The utility of complement assays in clinical immunology : A comprehensive review International Federation of Clinical Chemistry. **Journal of Autoimmunity**, v. 95, n. October, p. 191–200, 2018.

- LUZ, L. E. C.; KANUNFRE, C. C.; PALUDO, K. S.; DA SILVA JUSTO, A.; PETRY, V. K.; LEMES, B. M.; BARISON, A.; NEPEL, A.; WANG, M.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. L. Cytotoxic biomonitored study of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 183, p. 29–37, 2016.
- LUZ, L. E. C.; PALUDO, K. S.; SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; KLEIN, T.; SILVA, R. Z.; BELTRAME, F. L.; BUDEL, J. M. Cytotoxicity of latex and pharmacobotanical study of leaves and stem of *Euphorbia umbellata* (Janaúba). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 344–352, 2015.
- MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, n. March, 2019.
- MAMIDI, S.; HÖNE, S.; KIRSCHFINK, M. The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion. **Immunobiology**, v. 222, n. 1, p. 45–54, 2017.
- MARKIEWSKI, M. M.; LAMBRIS, J. D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. **American Journal of Pathology**, v. 171, n. 3, p. 715–727, 2007.
- MARTIN, S. J.; HENRY, C. M. Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 87–89, 2013.
- MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Clearance De Imunocomplexos: Papel Do Complemento e dos Polimorfonucleares Neutrófilos. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 30, n. 2, p. 234, 2013.
- MATA, R. C. S.; DE MENDONÇA, D. I. M. D.; VIEIRA, L.; DOS SANTOS, A. F.; DA SILVA, L. A.; GASPAR, J. F.; MARTINS, C.; RUEFF, J.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal activity of compounds isolated from *Euphorbia conspiciua* N. E. Br. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1880–1887, 2011.
- MAWA, S.; JANTAN, I.; HUSAIN, K. Isolation of terpenoids from the stem of ficus aurantiaca griff and their effects on reactive oxygen species production and chemotactic activity of neutrophils. **Molecules**, Ireland, v. 21, n. 9, p. 1–14, 2016.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.
- MELIS, J. P. M.; STRUMANE, K.; RUULS, S. R.; BEURSKENS, F. J.; SCHUURMAN, J.; PARREN, P. W. H. I. Complement in therapy and disease Regulating the complement system with antibody-based therapeutics. **Molecular Immunology**, v. 67, n. 2, p. 117–130, 2015.
- MERI, S. Self-nonsself discrimination by the complement system. **FebsLetters**, v. 590, p. 2418–2434, 2016.
- MERLE, N. S.; CHURCH, S. E.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L. T. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JUN, p. 1–30, 2015. a.

MERLE, N. S.; NOE, R.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L. T. Complement system part II: Role in immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAY, p. 1–26, 2015. b.

MICHAEL, M.; VERMEREN, S. A neutrophil-centric view of chemotaxis. **Essays In Biochemistry**, n. August, p. 1–12, 2019.

MIN, B. S. Anticomplementary activity of oleanane-type triterpenes from the roots of *Aceriphyllum rossii*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 6, p. 1003–1008, 2012.

MIN, B. S.; LEE, I. S.; CHANG, M. J.; JAE, K. Y.; NA, M. K.; TRAN, M. H.; PHUONG, T. T.; LEE, J. P.; KIM, J. H.; JIN, C. K.; MI, H. W.; JAE, S. C.; LEE, H. K.; BAE, K. H. Anticomplementary activity of triterpenoids from the whole plant of *Aceriphyllum rossii* against the classical pathway. **Planta Medica**, v. 74, n. 7, p. 726–729, 2008.

MINOZZO, B. R.; LEMES, B. M.; JUSTO, A. D. S.; LARA, J. E.; PETRY, V. E. K.; FERNANDES, D.; BELLÓ, C.; VELLOSA, J. C. R.; CAMPAGNOLI, E. B.; NUNES, O. C.; KITAGAWA, R. R.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. L. Anti-ulcer mechanisms of polyphenols extract of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 29–40, 2016.

MORAES, L. G. De; ALONSO, A. M.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Plantas medicinais no tratamento do câncer : uma breve revisão de literatura. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 9, p. 77–99, 2011.

MORENO-INDIAS, I.; DODDS, A. W.; ARGÜELLO, A.; CASTRO, N.; SIM, R. B. The complement system of the goat : Haemolytic assays and isolation of major proteins. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 1, 2012.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. v. 65, p. 55–63, 1983.

MUNHOZ, A. C. M.; MINOZZO, B. R.; CRUZ, L. S.; OLIVEIRA, T. L. T. L.; MACHADO, W. M.; PEREIRA, A. V.; FERNANDES, D.; MANENTE, F. A.; VELLOSA, J. C. R. J. C. R.; NEPEL, A.; BARISON, A.; BELTRAME, F. L. F. L. Chemical and pharmacological investigation of the stem bark of *Synadenium grantii*. **Planta medica**, Germany, v. 80, n. 6, p. 458–464, 2014.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre. 2014.

NARDIN, J. M.; DE SOUZA, W. M.; LOPES, J. F.; FLORÃO, A.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Effects of *Himatanthus lancifolius* on human leukocyte chemotaxis and their adhesion to integrins. **Planta Medica**, v. 74, n. 10, p. 1253–1258, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. 2016.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. G.; FERRAZ, C. A. A.; SILVA, J. C.; TELES, R. B. A.; SILVA, M. G.; DINIZ, T. C.; DOS SANTOS, U. S.; DE SOUZA, A. V. V.; NUNES, C. E. P.;

SALVADOR, M. J.; LORENZO, V. P.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. S. Neuropharmacological effects of essential oil from the leaves of *Croton conduplicatus* Kunth and possible mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 221, n. March, p. 65–76, 2018.

ORTÊNCIO, W. B. Medicina popular do Centro-Oeste. **Thesaurus**, n. 2, 1997.

PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; MARCON, R.; NASCIMENTO, A. F. Z.; CALIXTO, J. B.; PIANOWSKI, L. F. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, n. 1–3, p. 413–420, 2013.

PATIL, K. R.; MAHAJAN, U. B.; UNGER, B. S.; GOYAL, S. N.; BELEMKAR, S.; SURANA, S. J.; OJHA, S.; PATIL, C. R. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4367, 2019.

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016.

PENG, Q.; LI, G.; MA, Y.; HUANG, J.; WEI, X.; WANG, J. Chemical constituents of *Euphorbia kansui*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 64–66, 2012.

PÉREZ-ROSÉS, R.; RISCO, E.; VILA, R.; PEÑALVER, P.; CAÑIGUERAL, S. Effect of Some Essential Oils on Phagocytosis and Complement System Activity. **Journal of Agricultural and food chemistry**, n. 63, p. 1496–1504, 2015.

PETRI, B.; SANZ, M. J. Neutrophil chemotaxis. **Cell and Tissue Research**, v. 371, n. 3, p. 425–436, 2018.

PIO, R.; AJONA, D.; LAMBRIS, J. D. Complement inhibition: a promising concept for cancer treatment. **Semin Immunol.**, v. 25, n. 1, p. 54–64, 2013.

PRESIBELLA, M. M.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Influência de extratos hidroetanólicos de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, 2003.

RAJESH, R.; SHIVAPRASAD, H. V.; RAGHAVENDRA GOWDA, C. D.; NATARAJU, A.; DHANANJAYA, B. L.; VISHWANATH, B. S. Comparative study on plant latex proteases and their involvement in hemostasis: A special emphasis on clot inducing and dissolving properties. **Planta Medica**, v. 73, n. 10, p. 1061–1067, 2007.

RAO, P. V.; NALLAPPAN, D.; MADHAVI, K.; RAHMAN, S.; JUN WEI, L.; GAN, S. H. Phytochemicals and Biogenic Metallic Nanoparticles as Anticancer Agents. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

REDDY, Y. N. V.; SIEDLECKI, A. M.; FRANCIS, J. M. Breaking down the complement system: A review and update on novel therapies. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 26, n. 2, p. 123–128, 2017.

REGINATTO, F. H. Introdução à análise fitoquímica. In: ARTMED (Ed.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre. 2017.

REIS, E. S.; MASTELLOS, D. C.; RICKLIN, D.; MANTOVANI, A.; LAMBRIS, J. D. Complement in cancer: untangling an intricate relationship. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 1, p. 5–18, 2018.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; EL-SALAM, M. A.; BASTOS, J. K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: A review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253–268, 2018.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement - a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 785–797, 2011.

RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 8, p. 1–7, 2013.

RICKLIN, D.; REIS, E. S.; LAMBRIS, J. D. **Complement in disease: a defence system turning offensive**, 2016.

RISCO, E.; GHIA, F.; VILA, R.; IGLESIAS, J.; ÁLVAREZ, E.; CAÑIGUERAL, S. Immunomodulatory Activity and Chemical Characterisation of Sangre de Drago (Dragon's Blood) from *Croton lechleri*. **Planta Medica**, v. 69, n. 9, p. 785–794, 2003.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2005.

ROGERS, T. J.; STEELE, A. D.; HOWARD, O. M. Z.; OPPENHEIM, J. J. Bidirectional Heterologous Desensitization of Opioid and Chemokine Receptors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, n. 1, p. 19–28, 2006.

ROOS, A.; NAUTA, A. J.; BROERS, D.; FABER-KROL, M. C.; TROUW, L. A.; DRIJFHOUT, J. W.; DAHA, M. R. Specific Inhibition of the Classical Complement Pathway by C1q-Binding Peptides. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 12, p. 7052–7059, 2001.

ROOS, A.; WIESLANDER, J. Evaluation of Complement Function by ELISA. In: **The complement system: Methods and Protocols**. Humana Press, 2014.

SANCHEZ-CORRAL, P.; POUW, R. B.; LOPEZ-TRASCASA, M.; JÓZSI, M. Self-Damage Caused by Dysregulation of the Complement Alternative Pathway : Relevance of the Factor H Protein Family. **Frontier in Immunology**, v. 9, n. July, p. 1–19, 2018.

SAWADOGO, W. R.; SCHUMACHER, M.; TEITEN, M. H.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Traditional West African pharmacopeia , plants and derived compounds for cancer therapy. v. 84, p. 1225–1240, 2012.

SAYEGH, E. T.; BLOCH, O.; PARSA, A. T. Complement anaphylatoxins as immune regulators in cancer. **Cancer Medicine**, p. 747–758, 2014.

SCHMIDT, C. Q.; LAMBRIS, J. D.; RICKLIN, D. Protection of host cells by complement regulators. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 152–171, 2017.

SCHWABE, R. F.; LUEDDE, T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 25, n. 3, p. 289–313, 2016.

SEO, H. W.; HUNG, T. M.; NA, M.; JUNG, H. J.; KIM, J. C.; CHOI, J. S.; KIM, J. H.; LEE, H. K.; LEE, I.; BAE, K.; HATTORI, M.; MIN, B. S. Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 11, p. 1573–1579, 2009.

SHI, Q.; SU, X.; KIYOTA, H. Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. p. 4295–4327, 2008.

SILVA, V. A. O.; ROSA, M. N.; MIRANDA-GONÇALVES, V.; COSTA, A. M.; TANSINI, A.; EVANGELISTA, A. F.; MARTINHO, O.; CARLONI, A. C.; JONES, C.; LIMA, J. P.; PIANOWSKI, L. F.; REIS, R. M. Euphol, a tetracyclic triterpene, from *Euphorbia tirucalli* induces autophagy and sensitizes temozolomide cytotoxicity on glioblastoma cells. **Investigational New Drugs**, v. 37, n. 2, p. 223–237, 2019.

SILVA, V. A. O.; ROSA, M. N.; TANSINI, A.; OLIVEIRA, R. J. S. S.; MARTINHO, O.; LIMA, J. P. J. P.; PIANOWSKI, L. F.; REIS, R. M. In vitro screening of cytotoxic activity of euphol from *Euphorbia tirucalli* on a large panel of human cancer-derived cell lines. **Experimental and therapeutic medicine**, Greece, v. 16, n. 2, p. 557–566, 2018.

TENG, Y.; WANG, Y.; HSU, P.; XIN, G.; ZHANG, Y.; MORRIS, S. L.; GOTO, M.; LEE, K.; CAROLINA, N.; HILL, C.; CAROLINA, N.; ROAD, Y. Mechanism of Action of Cytotoxic Compounds from the Seeds of *Euphorbia lathyris*. **Phytomedicine**, p. 62–66, 2019.

SCHIFINO-WITTMANN, T. M. Determinação Da Quantidade De Dna Nuclear Em Plantas. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 897–902, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. D.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre. TROUW, L. A.; PICKERING, M. C.; BLOM, A. M. The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 9, p. 538–547, 2017.

TSACHEVA, I.; ODJAKOVA, M.; KOJOUHAROVA, M.; KRAUS, W.; ROSTAN, J.; VOGLER, B.; IOSSIFOVA, T.; KOSTOVA, I.; NAVAS, H. Complement Inhibiting Properties of Dragon's Blood from *Croton draco*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 59, n. 7–8, p. 528–532, 2004.

TSOPMO, A.; KAMNAING, P. Phytochemistry Letters Terpenoids constituents of *Euphorbia sapinii*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 218–221, 2011.

UZABAKILIHO, C.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 11, p. 3041–3045, 1987.

VAN DER MEER, F. J.; FABER, D. J.; AALDERS, M. C. G.; POOT, A. A.; VERMES, I.; VAN LEEUWEN, T. G. Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 2, p. 259–267, 2010.

VARELA, M. L.; MOGILDEA, M.; MORENO, I.; LOPES, A. Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1115–1127, 2018.

VASAS, A.; HOHMANN, J. **Euphorbia diterpenes: Isolation, Structure, biological activity, and synthesis (2008-2012)**, 2014.

WACZUK, E. P.; PEREIRA, K. B.; MACHADO, M. M.; OLIVEIRA, L. F. De. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos da *Euphorbia tirucalli* L: Dos riscos às possibilidades. **Acta ambiental catarinense**, v. 9, n. 55, p. 35–56, 2012.

WANG, L.; WANG, G.; YANG, D.; GUO, X.; XU, Y.; FENG, B.; KANG, J. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. **Molecular medicine reports**, Greece, v. 8, n. 4, p. 1279–1285, 2013.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.

WANG, S.; LIANG, H.; ZHAO, Y.; WANG, G.; YAO, H.; KASIMU, R.; WU, Z.; LI, Y.; HUANG, J.; WANG, J. New triterpenoids from the latex of *Euphorbia resinifera* Berg. **Fitoterapia**, v. 108, p. 33–40, 2016. a.

WANG, S.; WANG, Y.; LIU, X.; GUAN, L.; YU, L.; ZHANG, X. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of taraxasterol on adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 187, p. 42–48, 2016. b.

WITT, E.; SCHMIDTMANN, E. Nachuntersuchung der Behandlungsergebnisse bei Raumenge im Eckzahn-Prämolaren-Bereich - Ein Beitrag zum Problem "Extraktion oder Dehnung". **Fortschritte der Kieferorthopädie**, v. 29, n. 2, p. 205–214, 1968.

YANG, J. L.; LIN, J. H.; WENG, S. W.; CHEN, J. C.; YANG, J. S.; AMAGAYA, S.; FUNAYANA, S.; WOOD, W. G.; KUO, C. L.; CHUNG, J. G. Crude extract of *Euphorbia formosana* inhibits the migration and invasion of DU145 human prostate cancer cells: The role of matrix metalloproteinase-2/9 inhibition via the MAPK signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 7, n. 5, p. 1403–1408, 2013.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; YOSHIDA, Z.-Y.; TAKIDO, M. Inhibitory Effect of Euphol, a Triterpene Alcohol from the Roots of *Euphorbia kansui*, on Tumour Promotion by 12- O -Tetradecanoylphorbol-13-acetate in Two-stage Carcinogenesis in Mouse Skin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 1, p. 119–124, 2000.

YOON, N. Y.; MIN, B. S.; LEE, H. K.; PARK, J. C.; CHOI, J. S. A potent anti-complementary acylated sterol glucoside from *Orostachys japonicus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 8, p. 892–896, 2005.

YUNES, R. .; CECHINEL, F. Química de Produtos Naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia. In: UNIVALI (Ed.). **Química de Produtos Naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 5^a ed. Itajaí, SC.

ZHANG, C. Y.; WU, Y. L.; ZHANG, P.; CHEN, Z. Z.; LI, H.; CHEN, L. X. Anti-inflammatory Lathyrane Diterpenoids from *Euphorbia lathyris*. **Journal of Natural Products**, v. 3, p. 2–10, 2019.

ZHANG, K.-C.; CAO, Y.-D.; YAO, F.; ZHANG, L.; DING, A.-W. Acute toxicity of *Euphorbiae Pekinensis Radix* and vinegar-processing *Euphorbiae pekinensis Radix* on zebrafish embryo. China, v. 42, n. 12, p. 2291–2297, 2017.

ZHU, A.; SUN, Y.; ZHONG, Q.; YANG, J.; ZHANG, T.; ZHAO, J.; WANG, Q. Effect of euphorbia factor L1 on oxidative stress, apoptosis, and autophagy in human gastric epithelial cells. **Phytomedicine**, v. 64, n. February, p. 152929, 2019.

ZIPFEL, P. F. Complement and immune defense: From innate immunity to human diseases. **Immunology Letters**, v. 126, n. 1–2, p. 1–7, 2009.